

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Organická chemie



Bc. Ondřej Zemek

Organofosforové deriváty pro "click-chemistry"
Organophosphorus derivatives for "click-chemistry"

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 8. 2013

Obsah

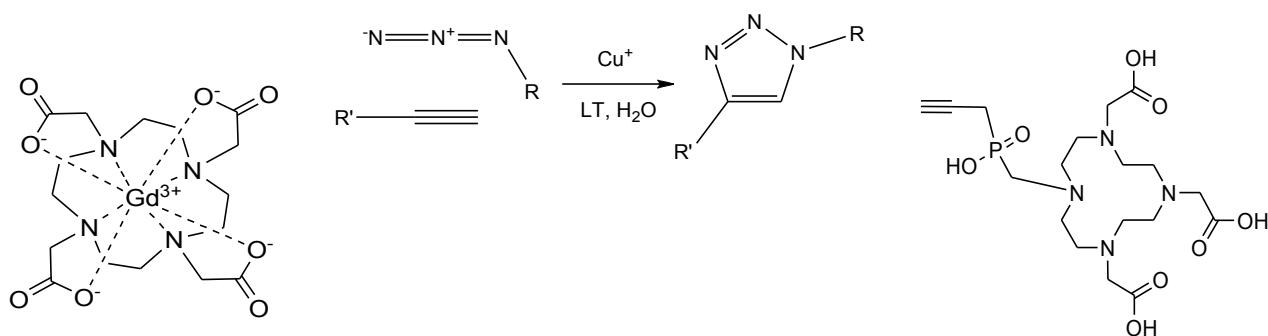
Úvod.....	1
1 Teoretický úvod.....	3
1.1 Princip NMR.....	3
1.2 MRI.....	4
1.2.1 MRI kontrastní látky.....	4
1.2.2 Relaxivita.....	6
1.2.3 Vnitřní koordinační sféra.....	7
1.2.4 Počet koordinovaných molekul vody q a vzdálenost r_{MH}	8
1.2.5 Druhá koordinační sféra.....	11
1.2.6 Vnější sféra.....	11
2 Cíl práce.....	13
3 Diskuze.....	14
4 Experimentální část.....	23
4.1 Použité chemikálie.....	23
4.2 Charakterizační metody.....	23
4.2.1 NMR.....	23
4.2.2 Tenkovrstevná chromatografie (TLC).....	24
4.2.3 MS.....	24
4.3 Syntézy.....	25
4.4 Komplexy.....	38
4.5 Stanovení hydratačního čísla q	40
4.5.1 Stanovení hydratačního čísla u $H[Eu^{3+}(12)]$	40
4.5.2 Stanovení hydratačního čísla u $H[Eu^{3+}(14)]$	41
5 Seznam zkratk.....	42
6 Závěr.....	44
7 Příloha.....	45
8 Seznam použité literatury.....	46
9 Poděkování.....	48

Úvod

MRI je neinvazivní diagnostická metoda používaná v klinické praxi k detekci nádorů, lézí a zobrazování vnitřních struktur obecně. Jednou z nevýhod MRI je poměrně nízký kontrast mezi některými zobrazovanými tkáněmi. Pro jeho prohloubení je možné aplikovat kontrastní látky, které zvýšením rychlosti relaxace atomů vodíku ve svém okolí mění odezvu poskytovanou vyšetřovanou tkání. Nejčastěji používané kontrastní látky obsahují gadolinité (Gd^{3+}) ionty, které díky sedmi nespárovaným elektronům vykazují vysokou paramagnetičnost. Kvůli značné toxicitě iontu Gd^{3+} je třeba jej aplikovat ve formě, která zabrání uvolňování iontů do organismu. Vhodnou a využívanou formou jsou komplexy Gd^{3+} s ligandy na bázi -aza- makrocyclů, například klinicky užívaný Dotarem® (obr. 1) a jemu podobné preparáty. Tyto látky vytváří velmi stabilní komplexy, avšak jejich tkáňová specifita není vysoká a je tedy nutné je podávat ve vysokých dávkách. Záměna jedné karboxylové skupiny v molekule DOTA za fosfinovou nebo fosfonovou zvyšuje rychlost výměny vody koordinované k iontu Gd^{3+} a tím i aktivitu kontrastní látky. Navíc je možné přes fosfinovou funkční skupinu navázat další strukturní motiv, který zaručí vyšší tkáňovou specifitu nebo umožní jiné modifikace. Jednou z možností je zakončení takovou funkční skupinou, která umožní snadné připojení široké škály molekul nejlépe s vysokým výtěžkem, jednoduchým provedením za mírných podmínek a velkou tolerancí vůči jiným funkčním skupinám. Zároveň by vzniklá spojovací část (linker) měla být stabilní, krátká a rigidní, aby omezovala nezávislý pohyb obou částí, protože ten negativně ovlivňuje účinnost kontrastní látky.

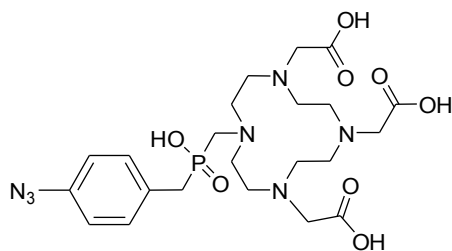
Vhodným spojovacím motivem využívaným v moderní chemii pro podobné účely je měďnými ionty katalyzovaná 1,3-dipolární cykloadiční reakce mezi organickým azidem a terminálním alkynem, zařazená pro svoji jednoduchost a univerzalitu do konceptu „click chemistry“ (obr. 2).

Tato diplomová práce se zabývá syntézou potenciální MRI kontrastní látky na bázi DOTA s jednou acetátovou skupinou nahrazenou methylen(prop-2-ynylfosfinovou) kyselinou (obr. 3), která umožní snadné připojení modulárním způsobem k jiným funkčním molekulám či částicím.



Obr. 3 cílová molekula

Protože v některých případech může být přístupnější molekula, na kterou chceme komplex Gd^{3+} navázat, ve formě terminálního alkynu, je zajímavý i DOTA fosfinátový analog opatřený azidovou funkční skupinou. Snadno dostupným motivem je azid vázaný na aromatickém jádře (obr. 4), zvláště proto, že při syntéze můžeme vyjít z dostupného aromatického aminu.



Obr. 4 druhý cílový ligand

1 Teoretický úvod

1.1 Princip NMR

Každé jádro atomu s lichým počtem protonů nebo neutronů se projevuje navenek spinem odlišným od nuly. Například pro v živých organismech nejzastoupenější jádra ^1H nabývá hodnot $+1/2$ nebo $-1/2$. Pokud taková jádra vystavíme stacionárnímu magnetickému poli, chovají se podobně jako miniaturní magnety a orientují svůj magnetický dipólový moment paralelně nebo antiparalelně k tomuto poli. Paralelní orientace je mírně energeticky zvýhodněna, přičemž rozdíl energetických hladin různě orientovaných jader je přímo úměrný síle vnějšího pole. Populovanost hladin je dána rozdílem jejich energií podle Boltzmannova distribučního zákona:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad [1],$$

kde N_1 a N_2 jsou počty částic v jednotlivých stavech, ΔE je rozdíl jejich energií, k Boltzmannova konstanta a T termodynamická teplota. Frekvence záření ν , které po absorpci způsobí přeskok (rezonanci) z nižší energetické hladiny do vyšší má hodnotu:

$$\nu = \frac{B_0 \gamma_I}{2\pi} \quad [2],$$

kde B_0 je síla vnějšího magnetického pole a γ gyromagnetický poměr daného jádra (např. pro ^1H 42,576 MHz/T). V atomárním měřítku je velikost magnetického pole mírně ovlivněna například blízkostí jiných jader, což se projevuje také změnou rezonanční frekvence. Pro magnetické pole o velikosti několika jednotek Tesla, v NMR měřeních běžně používané, je tento rozdíl v řádu miliontin (ppm).

Vektorovým součtem magnetických dipólových momentů všech jader dostaneme výsledný magnetický vektor látky umístěné v magnetickém poli.

Působíme-li na látku elektromagnetickým pulsem o frekvenci ν , bude docházet k absorpci energie a k vyrovnání populovanosti energetických hladin, čímž zanikne vektor magnetizace. Po ukončení pulsu se bude magnetizace navracet zpět k rovnovážné hodnotě, tj. systém bude relaxovat, podle rovnice:

$$M = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad [3],$$

kde M_0 je původní velikost vektoru magnetizace ve směru vnějšího magnetického pole, M je jeho aktuální hodnota v čase t a T_1 je spin-mřížkový (též longitudinální) relaxační čas. K této relaxaci dochází předáním energie do okolí (mřížky).

Druhým typem relaxace je spin-spinová (transverzální) relaxace, probíhající s relaxačním časem T_2 ,

při níž se energie přerozděluje uvnitř souboru jader a dochází ke zpomalení či zrychlení rotace jednotlivých jader vůči Larmorově frekvenci. Oba typy relaxace mají původ v drobných nehomogenitách magnetického pole v látce.

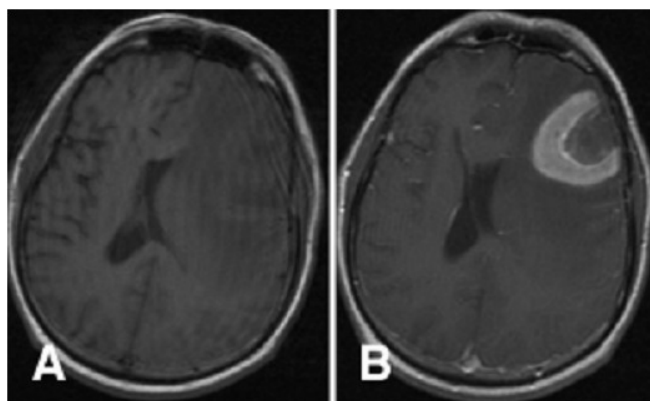
1.2 MRI

Zobrazování pomocí magnetické rezonance (**M**agnetic **R**esonance **I**maging) je neinvazivní lékařská diagnostická metoda umožňující vytvářet 2D a 3D snímky tkání, podobně jako CT (počítačová tomografie) nebo PET (pozitronová emisní tomografie). Na rozdíl od těchto metod nevyužívá ionizujícího záření, které je spojeno se známými vedlejšími účinky. Naopak nutnost použití silného magnetického pole (obvykle 1,5 či 3 T) v průběhu vyšetření vylučuje tuto metodu u pacientů s kardiostimulátory a dalšími elektronickými či některými kovovými implantáty.

MRI využívá stejného základního principu jako NMR, také zde dochází k vytvoření vektoru magnetizace atomů vodíku vlivem silného magnetického pole. Rozdílné podmínky v jednotlivých tkáních, jako je koncentrace protonů, jejich pohyblivost nebo přítomnost jiných atomů, se projeví na signálu, který poskytují. Na rozdíl od klasického NMR, kde je zásadní informací posun rezonanční frekvence jednotlivých atomů, se v MRI využívá nejčastěji rozdílů relaxačních časů T_1 nebo T_2 , které se projeví v rozdílné intenzitě signálů získaných z jednotlivých tkání. Takto vytvořené obrazy se označují jako T_1 nebo T_2 vážené. Hodnoty intenzity signálů je třeba získat samostatně z každé objemové jednotky (voxelu), která má tvořit bod výsledného zobrazení. Toho se dosahuje použitím gradientu magnetického pole, který umožňuje ovlivňovat vektor magnetizace jen v té rovině kolmé na gradient, kde je precesní frekvence sledovaných atomů rovna použité frekvenci. Postupným použitím na sebe kolmých gradientů pak lze definovat každý bod v zobrazovaném prostoru¹.

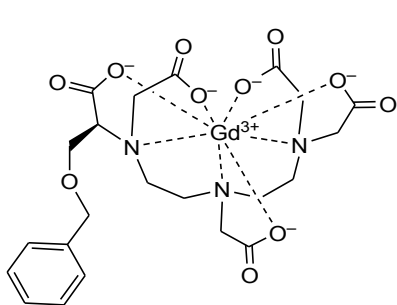
1.2.1 MRI kontrastní látky

Pro zvýšení kontrastu mezi signály z jednotlivých tkání anebo pro cílené zvýraznění sledovaných struktur v těle se využívají kontrastní látky. Velmi používané jsou zvláště v angiografii, sledování nádorů, lézí nebo nově při určování osudu transplantovaných kmenových buněk.

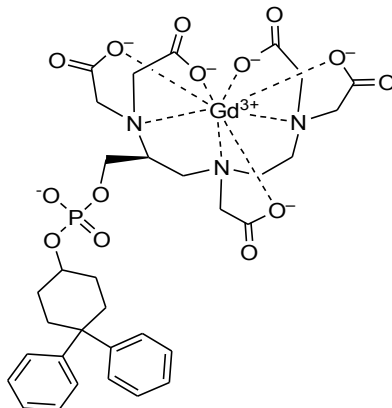


T_1 vážené snímky intrakraniálního tumoru **A)** bez a **B)** s CA na bázi gadolinia. Převzato z lit.²

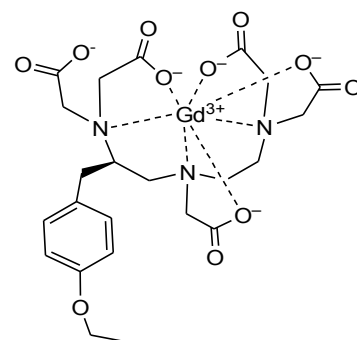
V klinické praxi zaznamenalo využití CA značný vzestup a je aplikováno u téměř 45 % MRI vyšetření³. Princip CA spočívá ve zvýšení nehomogenit magnetického pole na atomární úrovni, což v jejich blízkosti způsobuje urychlení T_1 i T_2 relaxace protonů molekul vody⁴



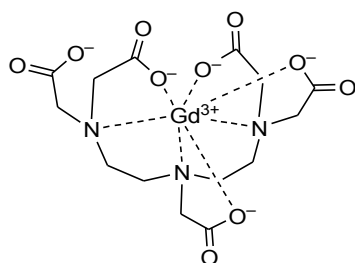
Multihance® (Gadobenate)



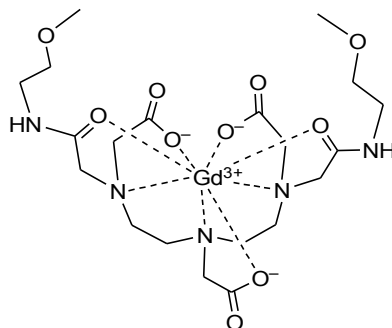
Ablavar® (Gadofosveset)



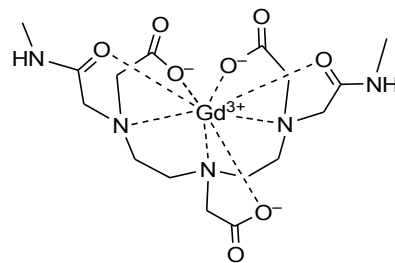
Eovist® (Gadoxetate)



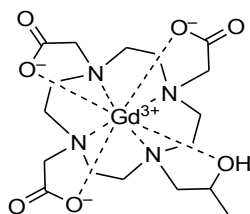
Magnevist® (Gadopentetate)



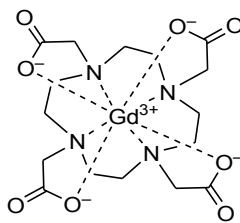
OptiMark® (Gadoversetamide)



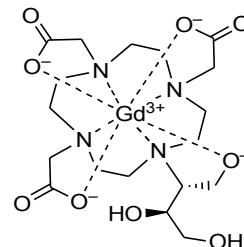
Omniscan® (Gadodiamide)



Prohance® (Gadoteridol)



Dotarem® (Gd-DOTA)



Gadavist® (Gadobutrol)

Nízkomolekulární CA na bázi komplexů Gd³⁺ schválené pro klinické použití, případné komplementární kationty a koordinovaná voda ($q = 1$ u všech látek) nejsou zobrazeny

Klinicky běžně používané CA můžeme z chemického pohledu rozdělit na dva typy: koloidní roztoky oxidů železa o velikosti částic asi 60–120 nm (tzv. SPIO a USPIO) a rozpustné komplexy paramagnetických iontů kovů (Mn²⁺ nebo Gd³⁺). Právě CA na bázi gadolinitých komplexů jsou v klinické praxi nejužívanější a také nejdéle dostupné (Magnevist od r. 1988)⁵. Gd³⁺ ionty jsou jako součást CA velice vhodné, neboť mají 7 nespárovaných elektronů a také dlouhý elektronový relaxační čas T_1 ; jejich nevýhodou je pak vysoká toxicita ($LD_{50} = 0,2–0,5$ mmol u myši)^{6,7}. Proto musí být vazba iontu v komplexu velice odolná, nejen vůči disociaci, ale také vůči výměně s jinými kovy přítomnými v organismu⁸. Jako ligandy se osvědčily karboxylové deriváty lineárních a

cyklických polyaminů.

Dnes klinicky běžně používané CA představují relativně malé hydrofilní molekuly, které se v těle distribuují poměrně rovnoměrně. Výzkumy vedené v této oblasti se snaží jednak o zvýšení efektivity a to jak konstrukcí selektivnějších CA, např. spojením s monoklonálními protilátkami, tak i zlepšením schopnosti ovlivňovat T_1 a T_2 v tkáni. Další cílem je konstrukce takových CA, které jsou schopny měnit NMR odezvu v závislosti na podmínkách, ve kterých se nachází, např. na koncentraci kovů či pH⁹.

1.2.2 Relaxivita

Paramagnetické částice vyvolávají ve svém okolí silné proměnné magnetické pole, které působí na protony blízkých molekul vody. Jejich relaxační časy T_1 a T_2 se zkracují podle vztahu

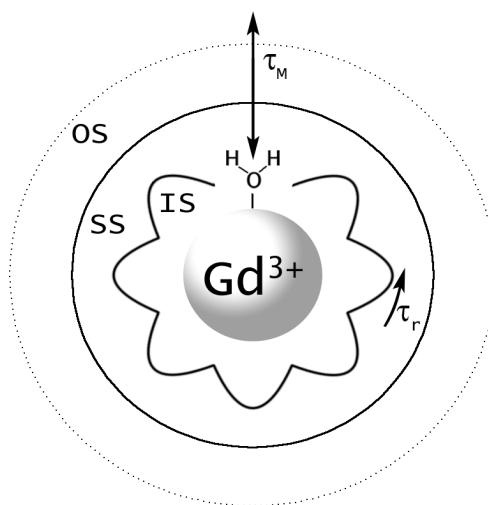
$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} \quad i = 1,2 \quad [4],$$

kde $T_{i,obs}$ je celkový pozorovaný relaxační čas, $1/T_{i,d}$ je diamagnetická rychlost relaxace rozpouštědla (zpravidla vody) bez paramagnetické látky a $1/T_{i,p}$ je paramagnetický příspěvek. $T_{i,d}$ se v tkáni v závislosti na podmínkách pohybuje kolem 1 s.

Velikost paramagnetického příspěvku je přímo úměrná koncentraci paramagnetické látky $[M]$ podle rovnice

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i [M] \quad i = 1,2, \quad [5],$$

kde r_i je relaxivita udávaná v $s^{-1}mmol^{-1}$. Tato veličina tedy charakterizuje účinnost kontrastních látek¹⁰.



Model kontrastní látky

Celková velikost r_i je součtem podílů relaxivity ze tří oblastí v blízkosti molekuly kontrastní látky podle rovnice

$$r_i = r_{i,OS} + r_{i,IS} + r_{i,2nd} \quad i = 1, 2 \quad [6],$$

kde r_{IS} je relaxivita daná přímo na ion kovu koordinovanou molekulou vody vnitřní sféry, r_{OS} je relaxivita molekul vody migrujících v blízkosti komplexu a r_{2nd} je příspěvek molekul vody vázaných na komplex jinak než přímou koordinací, např. vodíkovými můstky.

Další popis bude zaměřen na faktory ovlivňující r_1 , neboť kontrastní látky na bázi gadolinia se nejvíce uplatňují právě při T_1 -váženém snímkování.

Jednotlivé příspěvky k relaxivitě jsou závislé na řadě parametrů, jejichž vzájemné vztahy kvantitativně popisuje Solomon-Bloembergen-Morganova teorie. Níže jsou rozepsány ty, které mohou být optimalizovány za účelem zvýšení relaxivity. U dnes komerčně využívaných CA se relaxivita pohybuje do desítky $s^{-1}mM^{-1}$, tedy velmi nízko vzhledem k teoreticky dosažitelným hodnotám.

1.2.3 Vnitřní koordinační sféra

Relaxační příspěvek vnitřní sféry je závislý na rychlosti výměny molekul vody v ní s okolním prostředím, udávanou častěji v reciproké hodnotě – rezidentním čase τ_M . Dále závisí na počtu koordinačních míst vody q a relaxačním čase vázaných protonů T_{1M} a vztahuje se na molární zlomek paramagnetického iontu x_M :

$$r_{1,IS} = \frac{x_M q}{T_{1M} + \tau_M} \quad [7].$$

Rychlost relaxace vázaných iontů je ovlivněna jednak přes prostor působícím dipól-dipólovým mechanismem (DD), a také skalárním mechanismem (SC) působícím po chemických vazbách.

$$\frac{1}{T_{1M}} = r_{1M} = r_1^{DD} + r_1^{SC} \quad [8].$$

Velikost těchto příspěvků popisují Solomon-Bloembergenovy rovnice:

$$r_1^{DD} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_{MH}^6} S(S+1) \left[\frac{3\tau_{c1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2} + \frac{7\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c1}^2} \right] \quad [9]$$

$$r_1^{SC} = \frac{2S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\eta} \right)^2 \left[\frac{2\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} \right] \quad [10]$$

Kde μ_B je Bohrov magneton, γ_I gyromagnetický poměr jádra, g elektronový g-faktor, r_{MH} vzdálenost protonu od iontu a S celkový elektronový spin iontu. ω_I a ω_S jsou Larmorovy frekvence protonu a

elektronu, A/η je konstanta hyperjemného štěpení mezi jádrem a elektronem, a parametry τ_{c1} , τ_{c2} a τ_{e2} představují korelační časy, pro které platí:

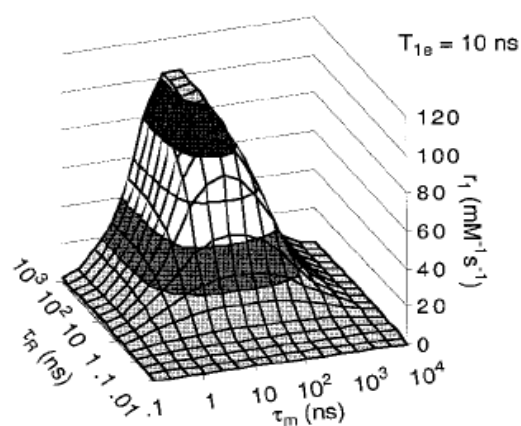
$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_{ei}} \quad i = 1, 2 \quad [11]$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{T_{ei}} + \frac{1}{\tau_M} \quad i = 1, 2 \quad [12],$$

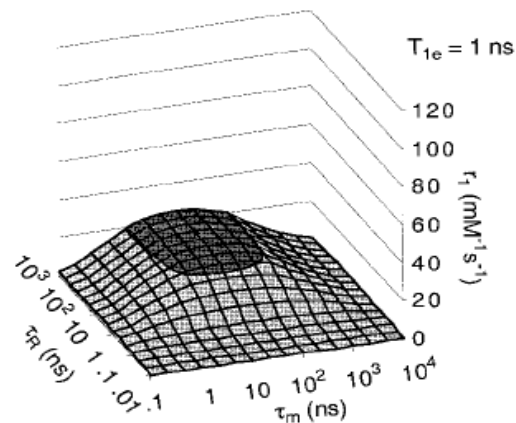
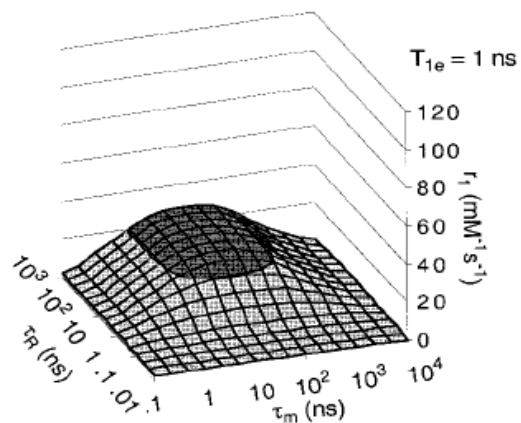
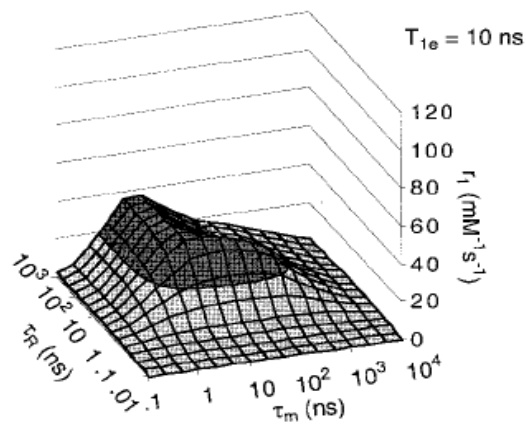
kde τ_R je rotační korelační čas molekuly komplexu a T_{e1} a T_{e2} jsou elektronové relaxační časy iontu.

Celkově je tedy patrné, že velikost relaxivity kontrastní látky závisí na mnoha faktorech, z nichž budou popsány ty, které mohou být optimalizovány za účelem jejího zvýšení.

0.5 T



1.5 T



Modely relaxivity vnější sféry pro různé intenzity magnetického pole (převzato z lit. ¹⁰)

1.2.4 Počet koordinovaných molekul vody q a vzdálenost r_{MH}

Relaxivita vnitřní sféry komplexu je přímo úměrná počtu molekul vody koordinovaných na ion Gd^{3+} , a jejich zvýšení vede k vyšší relaxivitě. Tento zisk je však zpravidla doprovázen značným snížením stability komplexu, což vede ke snazšímu uvolňování a výměnám Gd^{3+} za jiné ionty z okolního prostředí a tím k nárůstu toxicity. Proto je u všech komerčně využívaných produktů ve vnitřní sféře jen jedna molekula vody na atom gadolinia.

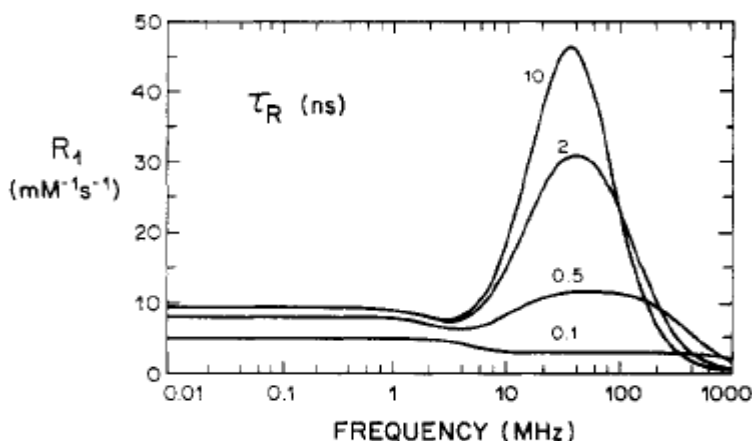
Ze vztahu [9] je patrné, že dipólová složka relaxivity klesá se šestou mocninou vzdálenosti od atomu gadolinia a tedy i její malé zkrácení by přineslo výrazné zvýšení relaxivity. Pomocí ESR byla tato vzdálenost určena na přibližně 0,31 nm u komplexů Gd^{3+} s koordinačním číslem 8 a 9. Také bylo zjištěno, že je téměř nezávislá na ligandech či celkovém náboji a tak zřejmě neposkytuje možnost zvýšení relaxivity.

Rotační korelační čas τ_R

Rotační korelační čas τ_R představuje jeden z relativně snadno optimalizovatelných parametrů. Jeho příspěvek k relaxivitě je dán rotací celé molekuly komplexu, což v jeho okolí vytváří proměnné magnetické pole. Je-li rotace příliš rychlá (τ_R malé), dochází ke zprůměrování těchto nerovnoměrností v magnetickém poli a tím k poklesu relaxivity. Považujeme-li molekulu za sférickou lze pro výpočet τ_R použít rovnice:

$$\tau_R = \frac{4\pi a^3 \eta}{3kT} \quad [13],$$

kde a je poloměr molekuly, η viskozita rozpouštědla, k Boltzmannova konstanta a T termodynamická teplota prostředí.

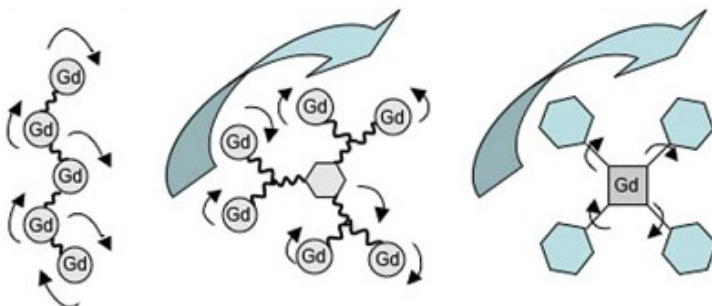


Graf (1)

Modelový graf ukazuje, jak různé τ_R ovlivní závislost R_1 na frekvenci při následujících parametrech: $S = 7/2$; $q = 1$; $r = 0,313$ nm; $\tau_M = 3$ ns; $\tau_{S0} = 0,1$ ns a $\tau_v = 40$ ps

Převzato z lit.⁴

Dnes komerčně využívané komplexy mají τ_R podstatně nižší než optimum. Ve snaze o jeho zvětšení můžeme zvýšit poloměr molekuly navázáním stericky náročných skupin, což se však může projevit i na distribuci v rámci tkání a systémové eliminaci.

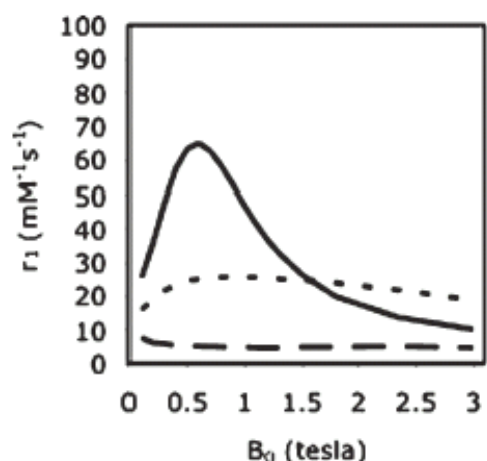


Různé strategie snížení τ_R . Lineární polymery umožňují pohyb jednotlivým monomerům, u dendrimerů je významný i pohyb celé molekuly, lokalizace Gd^{3+} do těžiště umožňuje jeho pohyb pouze s celou molekulou. Převzato z lit.¹¹

Další efekt, se kterým musíme počítat, je nezávislý pohyb iontu kovu a jeho blízkého okolí na zbytku molekuly. To se projeví zejména u komplexů kovu navázaných dlouhými a ohebnými spojkami na velké molekuly, např. proteiny nebo polymery.

Elektronový relaxační čas T_{1e}

Elektronový relaxační čas T_{1e} je silně závislý na intenzitě magnetického pole¹¹, při nízkých hodnotách ($< 0,1$ T) představuje dominantní prvek celkové relaxivity. Se vzrůstajícím magnetickým polem rychlost elektronové relaxace klesá, čímž vzrůstá celková relaxivita, zároveň se však zmenšuje význam T_{1e} a, jak ukazuje graf (2), začíná převažovat vliv τ_R .



Graf (2)

Závislost relaxivity na magnetickém poli pro různé τ_R :

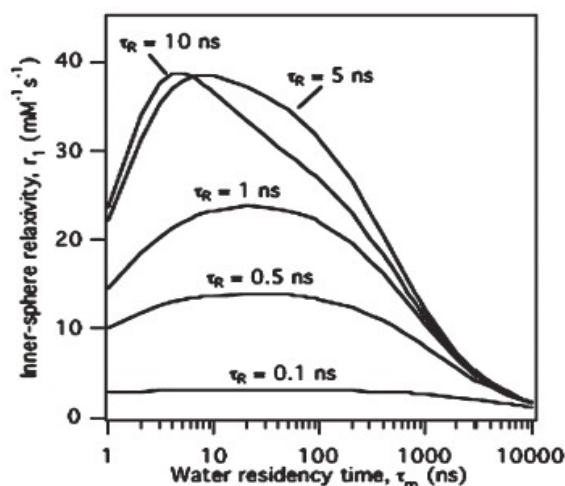
- $\tau_R = 0,1$ ns
- - - $\tau_R = 1$ ns,
- $\tau_R = 10$ ns,

Převzato z lit.¹²

V modelu SBM je počítáno se vznikem elektronové relaxace přes štěpení spinových hladin v nulovém poli (ZFS). To je přičítáno jednak odchylce koordinačního okolí Gd^{3+} od pravidelného oktaedru, a také distorzím, které jsou způsobeny kolizemi s molekulami rozpouštědla¹¹. Z hlediska navrhování a přípravy CA je T_{1e} značně obtížně predikovatelný parametr. Obecně se však ukazuje, že symetričtější komplexy mají díky delšímu T_{1e} vyšší relaxivitu při nízkých intenzitách pole, při vyšších hodnotách je však tento rozdíl zanedbatelný.

Residenční čas vody τ_M

Tato veličina udává, jakou rychlostí dochází k výměně molekul vody mezi koordinačním místem komplexu a okolním prostředím. Pokud je tato výměna příliš rychlá, dochází jen ke slabému ovlivnění magnetického stavu protonů vázaných molekul vody, pokud je příliš pomalá, je ovlivněných molekul jen málo. Jak ukazuje graf (3), nabývá na významu především u větších molekul, kde není limitujícím faktorem nízká hodnota τ_R .



Graf (3)

Závislost relaxivity na residenčním čase pro různé hodnoty τ_R a podmínky: $B = 1,5 \text{ T}$, $q = 1$ a $T_{e1} > 10 \text{ ns}$. Převzato z lit.¹¹

U většiny klinicky používaných CA je hodnota τ_R výrazně nižší než optimum¹³, proto se některé výzkumy zaměřily na jeho zvýšení. Lze toho dosáhnout například zvýšením sterického náročnosti

skupin v blízkosti paramagnetického centra; v případě ligandů na bázi DOTA je jednou z možností náhrada karboxylové skupiny za fosfinovou nebo fosfonovou¹⁴.

1.2.5 Druhá koordinační sféra

Srovnáním komplexů stejných iontů kovů s podobnou symetrií lišících se přítomností vody ve vnitřní koordinační sféře ($q = 1$ nebo 0) ukazuje, že příspěvek druhé a vnější sféry je téměř stejně velký jako jednoho koordinačního místa sféry vnitřní.

V případě, že ligand obsahuje silně elektronegativní skupiny (karboxylové, fosforečnanové), dochází k tvorbě vodíkových můstků s molekulami vody, takto vázaná voda pak tvoří druhou sféru. V ní stejně jako ve vnitřní sféře probíhá relaxace dipól-dipólovým mechanismem a je tedy pro popis relaxivity možno použít rovnici [9]. Příslušné parametry (τ_M' , r_{MH}' , q' atd.) však nejsou obvykle k dispozici a celkově je tato oblast méně prozkoumána.

1.2.6 Vnější sféra

Příspěvek vnější sféry je dán migrací molekul vody kolem komplexu paramagnetického iontu, působení na delší vzdálenost je zde vyváženo velkým počtem molekul vody v okolí. Pro další přiblížení je molekula CA uvažovaná jako nedeformovatelná koule. Pro takový model lze použít Freedovy rovnice:

$$r_{1,OS} = C[3j(\omega_I) + 7j(\omega_S)] \quad [14],$$

$$r_{2,OS} = C[2 + 1,5j(\omega_I) + 6,5j(\omega_S)] \quad [15],$$

$$C = \left(\frac{32\pi}{405} \right) \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 \eta^2 S(S+1) \frac{N_A [\text{Gd}^{3+}]}{1000aD} \quad [16],$$

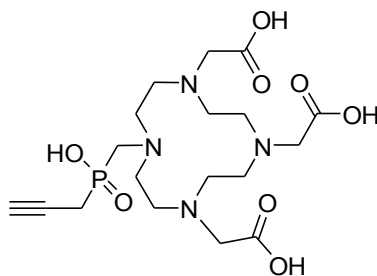
$$j(\omega_i) = \text{Re} \left[\frac{1 + \frac{1}{4} \left[\omega_i \tau_D + \left(\frac{\tau_D}{T_{le}} \right)^{\frac{1}{2}} \right]}{\left[1 + \left[\omega_i \tau_D + \frac{\tau_D}{T_{le}} \right]^{\frac{1}{2}} + \frac{4}{9} \left[\omega_i \tau_D + \frac{\tau_D}{T_{le}} \right] + \frac{1}{9} \left[\omega_i \tau_D + \frac{\tau_D}{T_{le}} \right]^{\frac{3}{2}} \right]} \right] \quad [18],$$

$$\tau_D = \frac{a_{\text{GdH}}^2}{D_{\text{GdH}}} \quad i = I, S \quad [19],$$

kde $[\text{Gd}^{3+}]$ je koncentrace komplexu, N_A Avogadrova konstanta, a_{GdH} nejmenší vzdálenost protonů od iontu gadolinia a D_{GdH} je difuzní koeficient protonů vody vzhledem ke komplexu.

2 Cíl práce

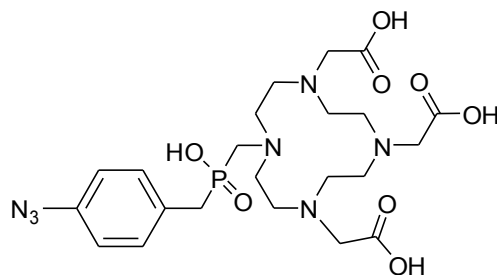
Prvním cílem této práce je připravit nový ligand vhodný pro komplexaci Gd^{3+} na základě osvědčeného strukturního motivu methylfosfínátového derivátu DO3A s potenciálním využitím jako MRI kontrastní látky. Součástí molekuly tohoto ligandu bude terminální alkynová skupina, která umožňuje snadné připojení k jiným molekulám přes Cu^+ -katalyzovanou 1,3-dipolární cykloadiční „click reakci“. Toto spojení bylo navrženo s ohledem na snížení nezávislého pohybu kontrastní látky po připojení na jinou molekulu díky rigiditě spojovacího 1,2,3-triazolového cyklu. Ze stejného důvodu je také žádoucí, aby i alkynová skupina byla co nejbližší a nejpevněji vázána k ligandu. Těmto požadavkům vyhovuje níže zobrazená látka.



1. cílová látka

Záměrem práce je syntéza a charakterizace popsaného ligandu, případně jeho komplexů s lanthanoidy a ověření jeho vhodnosti pro konjugaci přes CuAAC reakci.

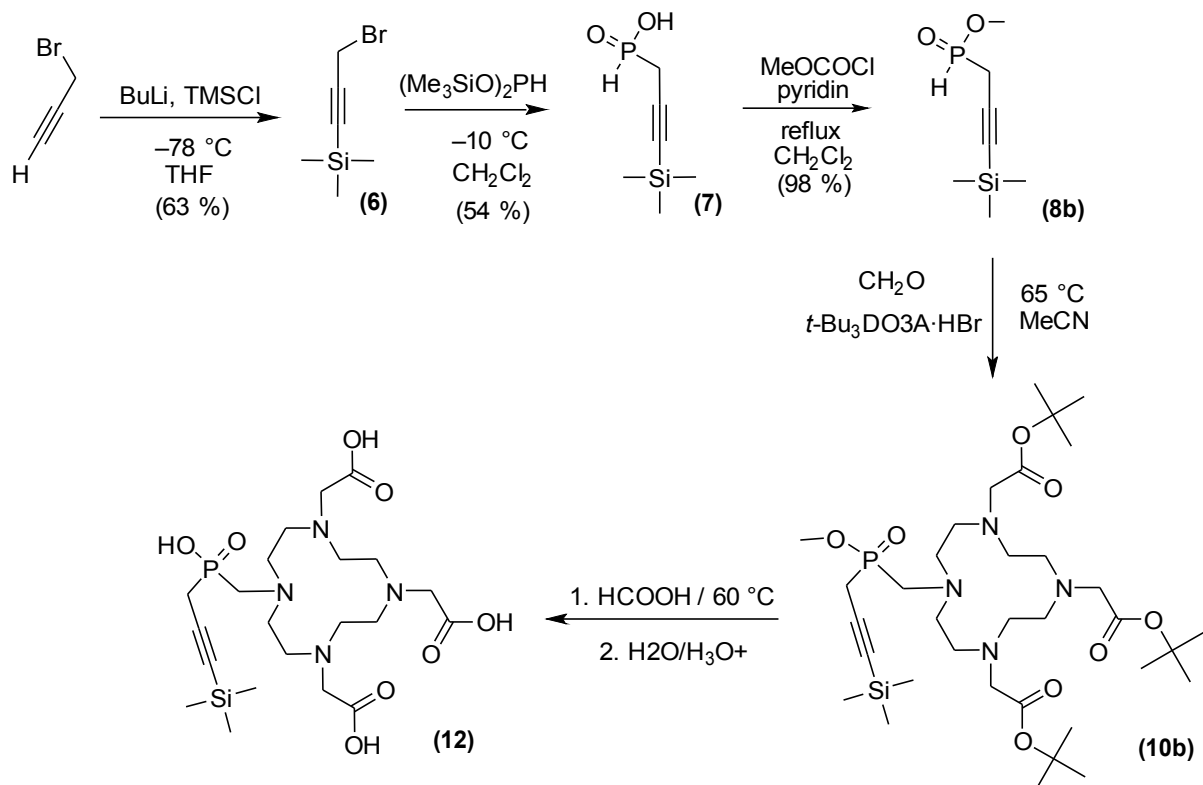
Druhým cílem je syntéza komplementárního ligandu s azidovou funkční skupinou a jeho komplexů.



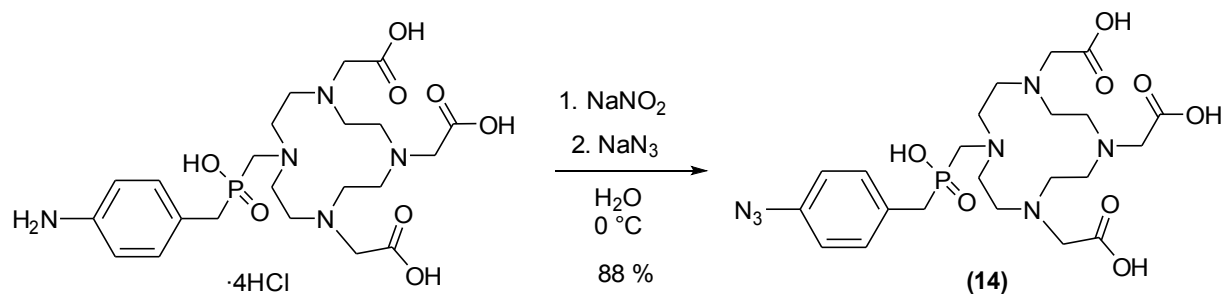
2. cílová látka

3 Diskuze

Reakční schéma syntézy cílového produktu **(12)**.

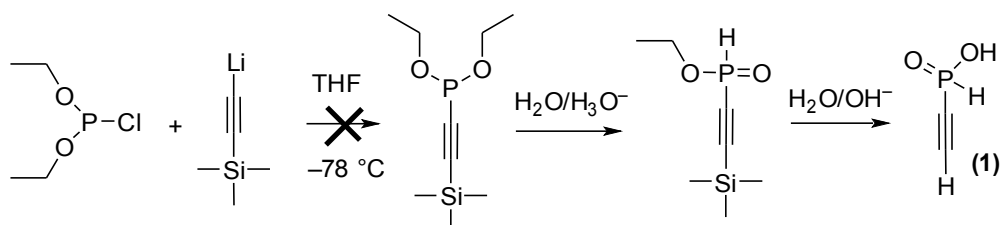


Reakce vedoucí k ligandu s azidovou funkční skupinou **(14)** z v literatuře popsáno ligandu.



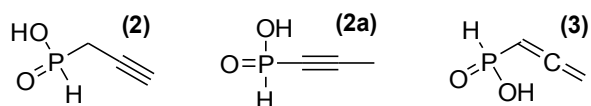
Z důvodů nastíněných v teoretické části je vhodné, aby spojení mezi fosfinovou a alkynovou částí molekuly bylo co nejkratší. Přímé spojení obou částí představuje dosud nepopsaná ethynylfosfinová kyselina **(1)**. Dosud byly připraveny a popsány pouze ethynylfosfonáty a bis(ethynyl)fosfináty a to způsoby, který nelze v tomto případě využít ¹⁵.

Pokusy o její přípravu reakcí diethylchlorfosfitu s trimethylsilylacetylidem lithným variacemi na postup převzatý z literatury¹⁶ nebyly úspěšné.



Produktem druhého kroku byla vždy směs kyseliny fosforené a sloučenin fosforu s několikanásobně vyšší molekulovou hmotností než zamýšlený produkt, které však neobsahovaly TMS skupinu. Možným řešením by bylo použití méně reaktivního acetylidu¹⁷. Takto byl nedávno připraven diethyl-ethynylfosfonit chráněný jako boranový adukt^{18,19}.

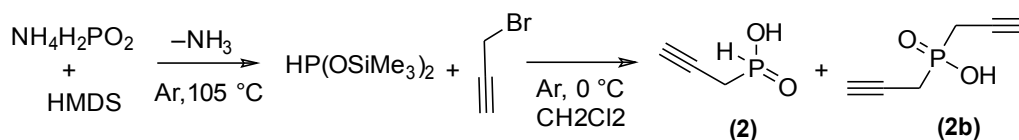
Kyselina prop-2-ynylfosfinová (propargylfosfinová) **(2)** představuje druhý nejkratší linker a samotný prop-2-ynylový synthon je snadněji dostupný a podobný alkylům, od kterých byly příslušné fosfinové kyseliny mnohokrát a několika cestami připraveny. Samotná **(2)** v literatuře popsána není, jsou však známy izomerní prop-1-ynylfosfinová **(2a)** a prop-1,2-dienylfosfinová (allenfosfinová) **(3)** kyselina.



Prop-1,2-dienylfosfinová **(3)** byla připravena podle lit.²⁰ v dobrém výtěžku a postupem z lit.²¹ převedena na ethylester **(3a)**. Ten byl podroben třidennímu zahřívání ve vlhkém diethyletheru s kovovým sodíkem, ve snaze docílit izomerizace na ethylester **(2)** analogicky k izomerizaci popsané např. pro hex-1,2-dien v lit.²² Po ukončení reakce však byl získán zpět jen původní ester **(3a)** spolu s pevnou žlutou, patrně polymerní, látkou neobsahující podle ³¹P NMR spektra P–H vazbu, kterou se však nepodařilo blíže identifikovat.

Bylo provedeno několik pokusů o syntézu kyseliny **(2)** metodami popsanými v literatuře pro přípravu alkylfosfinátů přes alkylaci, nicméně 3-brom-1-propyn obsahuje značně kyselý terminální vodík a samotná trojná vazba je přístupná adici elektrofilních činidel, proto jej nelze vystavit stejným podmínkám jako alkylfosfiny.

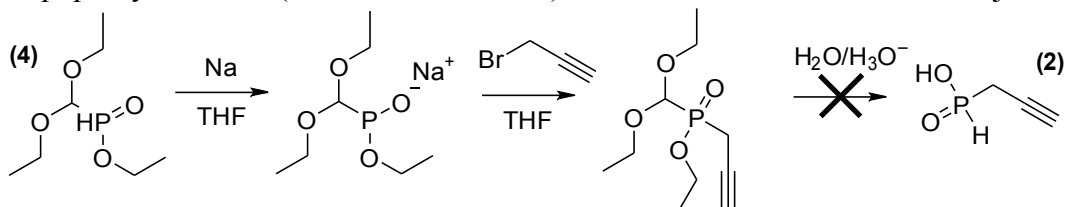
Příprava **(2)** přes bis(trimethylsilyl)hypofosfit podle lit.²³, tak jak je popsána v této práci pro **(2)** za použití prop-2-ynylbromidu, byla částečně úspěšná.



Produkt však obsahoval vždy značné množství (30–55 %) bis(prop-2-ynyl)fosfinové kyseliny **(2b)** a to i při použití několika ekvivalentů fosfitu vůči alkylačnímu činidlu. Pokud je navíc použit fosfornan ve velkém nadbytku, je obtížné jej separovat od produktu **(2)**, protože látky jsou velmi polární a mají podobné rozpustnosti. Chromatografická separace na koloně s náplní silikagelu je možná a nejlepšího dělení bylo dosaženo v soustavách THF:H₂O:sek. amin. Působením bazického prostředí však **(2)** izomerizuje nejprve na prop-1,2-dienfosfinovou kyselinu **(3)** (acetylen-allenový přesmyk) a při delším působení z **(3)** dále na prop-1-ynylfosfinovou kyselinu **(2a)**. V chromatografických frakcích se pak vyskytovaly všechny tři látky v různém zastoupení. Kvůli neuspokojivým výtěžkům (méně než 30 % před separací dle ³¹P NMR spektra) a obtížnosti separace byla nakonec tato cesta opuštěna.

Později byl nalezen vhodný způsob izolace, použitelný i pro jiné polární fosfinové kyseliny s krátkým řetězcem ze směsi mono- a di-alkylovaných kyselin a fosfinátu, a to převedením na ester variací na tzv. Hewittovu reakci^{21,24}, která byla v této práci použita pro syntézu esterů **(3a)** a **(8a-c)**. Po této reakci zůstává ester mono-alkylfosfinové kyseliny při extrakci v organické fázi, zatímco dialkylfosfinová kyselina, která neobsahuje P–H vazbu a není proto převedena na ester, přechází do vodné fáze. Příslušný ester fosforové kyseliny sice vzniká, je však v kyselém vodném prostředí nestálý a rychle hydrolyzuje na fosforovou kyselinu, která při extrakci rovněž přejde do vodné fáze.

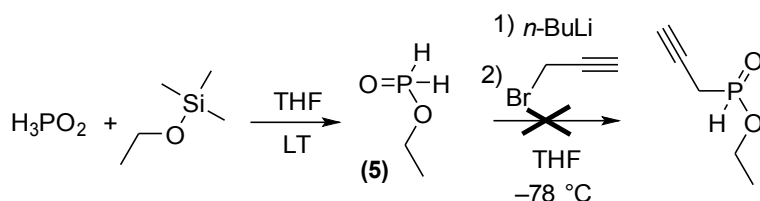
Jinou používanou metodou pro přípravu alkyl fosfinových kyselin je cesta přes tzv. Cyba-Geygi činidlo **(4)**, což je v podstatě fosforaná kyselina, jejíž jedna P–H vazba je chráněná hydrolyzovatelnou skupinou. Látka **(4)** byla připravena podle popsaného postupu²⁵ v dobrém výtěžku a z ní ester substituované prop-2-ynylfosfinové kyseliny. Nicméně při pokusu o hydrolyzu za podmínek popsaných v lit.²⁵ (var 24 h v 12M HCl) vedl k adici chlorovodíku na trojnou vazbu.



Byly vyzkoušeny také mírnější podmínky; 50 °C 6M HCl a delší čas, 10% H₂SO₄, 10 % CF₃COOH a 10 % NaOH, ale za těchto podmínek buď k hydrolyze nedocházelo, nebo za delší dobu vznikla neidentifikovatelná směs látek.

Další používanou metodou je alkylace esteru fosforové kyseliny **(5)** působením silné báze za nízké teploty²⁶. Ester není z důvodu nestability izolován a je použit přímo k alkylationi. Působení

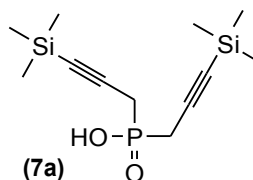
n-butyllithia však vedlo dle ^{31}P NMR spektra k bohaté směsi látek. Pokus byl několikrát opakován s jinými bázemi, ale bezúspěšně.



Neúspěch předchozích pokusů mohl být přičítán reaktivní terminální alkynové skupině, proto byla tato ochráněna standardním postupem, navázáním TMS. Tato chránicí skupina je dosti odolná v kyselém prostředí. Působením alkálií, fluoridů nebo stříbrných iontů je pak možné ji snadno odstranit²⁷.

Zavedení chránicí TMS skupiny bylo vyzkoušeno dvěma postupy; s použitím LDA jako báze variací postupu z lit.²⁸ a s použitím *n*-BuLi jako báze úpravou postupu v lit.²⁹ Po přečištění sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexanu byl získán bromid **(6)** ve výtěžku 51 % respektive 63 % pro druhou variantu. Metodu přípravy **(6)** s vyššími výtěžky, která však byla publikována až později a tak nebyla provedena, představuje chránění alkynové skupiny prop-2-ynolu pomocí TMS po deprotonizaci dvěma ekv. *n*-BuLi na hydroxylové i alkynové skupině (96 % výtěžek). Následující substituce hydroxylové skupiny bromem pomocí PBr_3 poskytlo po vakuové destilaci bromid **(6)** podle lit.³⁰ s výtěžkem 78 %.

Příprava 3-(trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinové kyseliny **(7)** je založena na postupu publikovaném v lit.²³ a stejně jako při přípravě kyseliny **(2)** dochází i zde ke vzniku dialkylovaného produktu **(7a)**.



V uvedeném článku²³ je popsána příprava mnoha monoalkylfosfinových kyselin ve vysokých výtěžcích (při ekvimolárním poměru fosfitu a alkylhalogenidu), aniž by u některé byl zmíněn vznik dialkylovaného produktu. Při přípravě látky **(7)** je však monoalkylfosfit patrně lepším substrátem pro další alkylaci než samotný H-fosfit. Byla proto provedena optimalizace reakčních podmínek (teplota: LT, 0 °C a –10 °C a rozpouštědlo: CH_2Cl_2 , CHCl_3 , THF a toluen) a v souladu s lit.²³ bylo nejlepších výsledků dosaženo v CH_2Cl_2 , nižší teplota vedla k menšímu množství dialkylovaného produktu. Přesto bylo potřeba použít alespoň 3 ekv. fosforanu proti látce **(6)**, aby se množství dialkylované fosforné kyseliny snížilo pod 5 %. Protože je však produkt **(7)** díky TMS skupině značně nepolárnější než **(7)**, je možné jej bez obtíží separovat od nadbytku fosforanu a

také chromatograficky rozdělit od vedlejšího produktu (**7a**) v nebazické nepolárnější chromatografické soustavě.

Stabilita (**7**) byla testována v různých prostředích, aby byly určeny vhodné podmínky pro další kroky syntézy. Látka (**7**) se nerozkládá při několikadenním zahřívání na 75 °C v kyselině octové, vodě nebo organických rozpouštědlech (toluen, MeCN, EtOH), není však stabilní v 6M HCl, kde dochází během několika hodin k odchránění TMS a adici HCl na trojnou vazbu. Také organické aminy ve formě volné báze (piperidin, *t*-Bu₃DO3A či TACN), které měly být substrátem v další reakci, způsobují i v bezvodých zředěných roztocích deprotektaci TMS a následnou acetylen-allenovou izomerizaci. Na základě těchto informací byly s látkou (**7**) hledány podmínky pro variantu Moerditz-Itani reakce³¹ (analogie reakce Mannichovy), která se běžně provádí v několikamolární HCl. Jako modelový sekundární amin byl použit piperidin, který je snadno dostupný a se kterým reakce podobného typu probíhají velmi dobře. Ukázalo se, že v prostředí kyseliny octové reakce probíhá dobře s piperidinem na (**7**), ale s *t*-Bu₃DO3A (volnou bází) nedošlo ani po týdenním zahřívání k žádné reakci.

Protože se nepodařilo nalézt podmínky, za kterých by se (**7**) nerozkládala a zároveň uspokojivě reagovala s *t*-Bu₃DO3A, byla (**7**) převedena na ethylester (**8a**) variantou Hewittovy²¹ reakce. Tato reakce byla popsána pro esterifikaci fenylfosfinové kyseliny²⁴, avšak v této práci byla úspěšně použita k přípravě několika esterů dvou jiných fosfinových kyselin (**7**) a (**3**). Oproti běžně používané Steglichově esterifikaci³² alkoholem za pomoci DCC a DMAP je tato reakce velmi rychlá a téměř kvantitativní. Zároveň odpadá problém s obtížnou separací dicyklohexylmočoviny. S esterem (**8a**) byly hledány optimální reakční podmínky pro reakci Mannichova typu s *t*-Bu₃DO3A; nejprve vhodné rozpouštědlo. Reakce byla prováděna v uzavřených 2 ml vialkách a průběh sledován pomocí ³¹P NMR spekter. Čísla uvádějí procentuální zastoupení produktu v celkovém integrálu ³¹P signálu.

čas	12 h	60 h	84 h	105 h	130 h
toluen	reakce neprobíhá, jen vznik vedlejších produktů				
CH ₃ COOH	reakce neprobíhá, jen vznik vedlejších produktů				
EtOH	0,0	2,9	4,8	6,1	6,5
MeCN	11,6	42,4	60,2	71,9	88,6
MeCN + Na ₂ SO ₄	10,2	40,3	64,1	80,0	91,7

Reakční podmínky: 90 mg *t*-Bu₃DO3A·HBr, 1,1 ekv. (**8a**), 1,1 ekv. CH₂O, 1 ml rozpouštědla, t = 45 °C, 200 mg Na₂SO₄

Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl určen bezvodý acetonitril, přídavek bezvodého Na₂SO₄ mírně urychloval průběh reakce, ale na výtěžek neměl měřitelný vliv a nebyl v dalších reakcích použit. Při použití *t*-Bu₃DO3A ve formě volné báze docházelo k reakci, ale zároveň docházelo na

produktu také k odstoupení chránicí TMS skupiny a přesmyku produktu (**10a**) na ester příslušné prop-1,2-dienfosfinové kyseliny, která dále přecházela na ester substituované prop-1-ynylfosfinové kyseliny.

Dále byla provedena optimalizace reakční teploty.

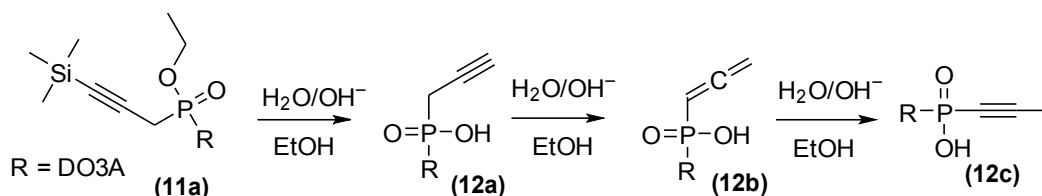
čas	9 h		23 h		40 h		65 h		11 dní	
	rea.	pro.	rea.	pro.	rea.	pro.	rea.	pro.	rea.	pro.
50°C	89,5	10,5	84,5	15,5	74,1	25,9	56,3	43,7	0	93,8
60°C	87,1	12,9	70,1	29,9	52,1	47,9	28,2	67,8	0	38,5
70°C	58,3	31,7	62,6	27,4	12,1	83,4	0	93,2	0	28,6
80°C	44,4	56,6	8,4	67,9	2,3	70,2	0	45,9	0	5,2

Reakční podmínky: 46,7 mg *t*-Bu₃DO3A·HBr, 1,03 ekv. (**8a**), 1,1 ekv. CH₂O, 0,65 ml suchý MeCN

Průběh byl opět sledován pomocí ³¹P NMR spekter, čísla vyjadřují procentuální zastoupení reaktantu (**8a**) (rea.) a produktu (**10a**) (pro.) v reakční směsi podle integrálů ³¹P signálů. Z tabulky vyplývá, že produkt se dlouhodobým zahříváním v reakční směsi za teplot vyšších než 50 °C rozkládá, za teplot nižších než 60 °C pak probíhá reakce dosti pomalu. Jako optimální bylo určeno teplotní rozmezí 60–70 °C, kdy je reakce kompletní během asi 3 dnů a zároveň nedochází k významné degradaci produktu. V dalších reakcích byl také použit mírný nadbytek esteru fosfinové kyseliny (**8**), aby byla zaručena konverze veškerého *t*-Bu₃DO3A. Zároveň je možné nadbytečný (**8**) oddělit vysrážením produktu diethyletherem, ve kterém se ester (**8**) částečně rozpouští. Reakce byla také provedena za přítomnosti volné kyseliny (**7**) spolu s esterem (**8a**), přičemž reagoval pouze ester a kyselina (**7**) zůstala v reakční směsi nezměněna v původním množství.

Odstranění chránících *t*-butylesterových skupin z karboxylů na derivátech DO3A se obvykle provádí působením trifluoroctové kyseliny v prostředí suchého aprotického rozpouštědla (CH₂Cl₂). V případě látky (**10a**) však tato cesta vedla také k částečnému odstranění TMS skupiny z acetylenů. Proto byla zvolena reakce s mravenčí kyselinou, která sice vyžaduje delší reakční čas, ale způsobí ochránění jen na karboxylových skupinách.

Hydrolýza ethylfosfinátu (**11a**) na volnou kyselinu probíhá dobře působením amoniaku nebo hydroxidu sodného ve vodných a alkoholických roztocích, za těchto podmínek však dochází zároveň k desilylaci a částečně také k přesmyku ze substituované kyseliny prop-2-ynylfosfinové (**12a**) na příslušnou prop-1,2-dienylfosfinovou (**12b**). Za vyšší teploty nebo delší reakční dobou přesmyk pokračuje dále na substituovanou kyselinu prop-1-ynylfosfinovou (**12c**).



Například zahřívání ethylesteru (**11a**) na 60 °C po 12 h v roztoku 25% NH_3 (aq.) : EtOH (1:5) vedlo ke kvantitativnímu převedení na amonnou sůl 10-({hydroxy[prop-1-ynyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7- trioctové kyseliny (**12c**).

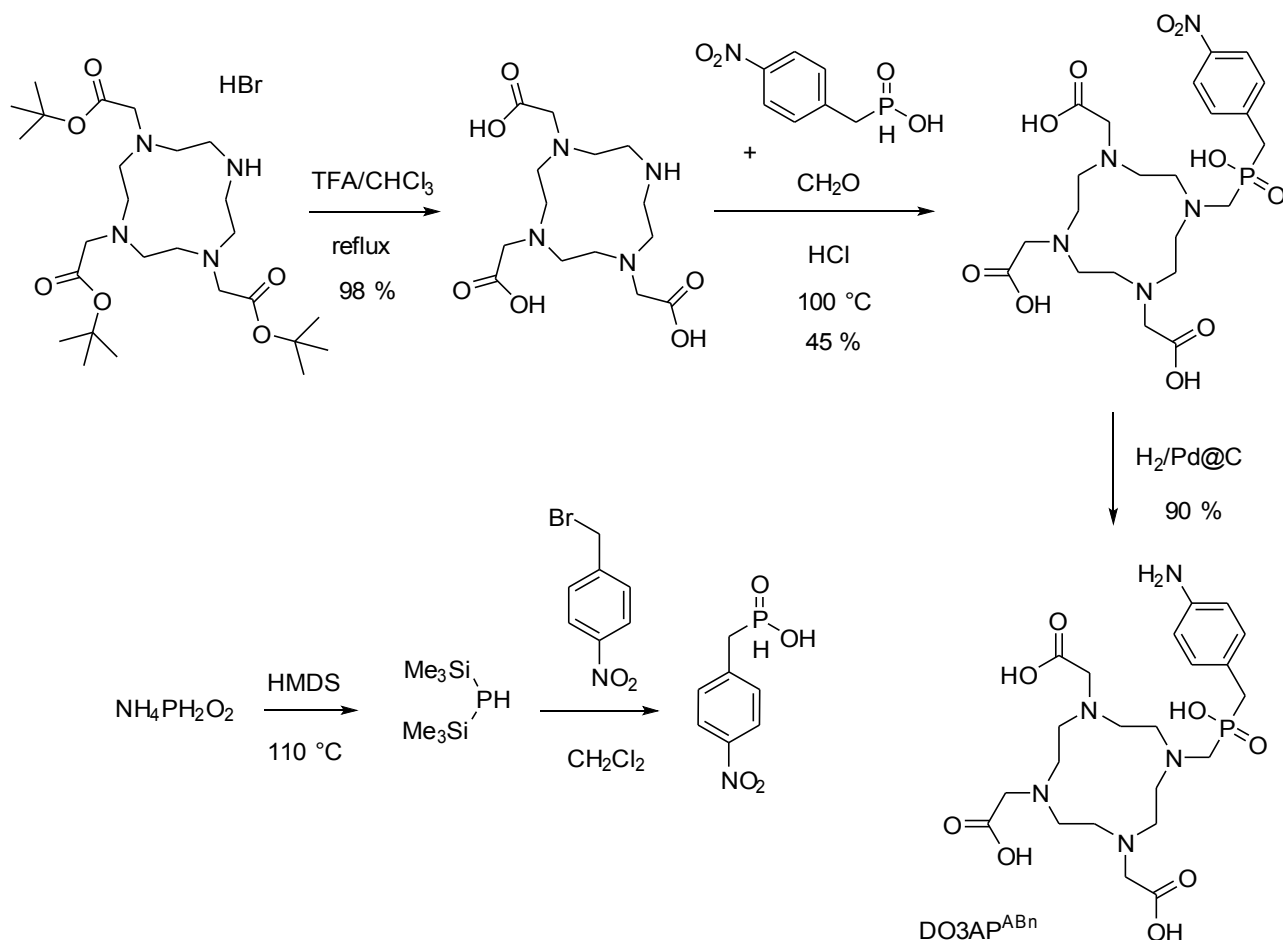
V kyselém vodném prostředí je ethylester (**11a**) značně stabilní, nepodařilo se najít podmínky, za kterých by se hydrolyzoval a zároveň zůstala nedotčená TMS chráněná alkynová skupina. Deesterifikace reakcí s Me_3SiBr za 4 °C v temnu a bezvodém prostředí nebyla úspěšná a vedla k neidentifikovatelné směsi produktů. Reakce s NaI, LiI nebo LiBr ve vodném prostředí, EtOH nebo MeCN, která se v některých případech pro deesterifikaci fosfinových a fosfonových kyselin používá, vůbec neprobíhaly ani při zahřívání na 60 °C.

Místo ethylesteru (**8a**) tak byl připraven methylester (**8b**) podle stejného postupu a byla s ním dále provedena stejná reakční cesta jako s ethylesterem (**8a**) na látku (**10b**). Při odchránění *t*-butylesterových skupin z karboxylů v prostředí 85% HCOOH docházelo z přibližně 50 % (podle intenzity ^{31}P NMR signálů) také k hydrolyze methylesteru. Reakční směs s obsahem volné kyseliny (**12**) a methylesteru (**11b**) byla proto dále kompletně hydrolyzována na volnou kyselinu v kyselém vodném prostředí za LT.

S ligandem (**12**) bylo vyzkoušeno odchránění terminální alkynové skupiny 1 ekv. KF ve vodném roztoku za LT. Reakce probíhala dle ^{31}P NMR bez vedlejších produktů, nebyl také pozorován žádný přesmyk na příslušnou prop-1,2-dienovou kyselinu (**12c**).

Připravený ligand (**12**) byl použit ke komplexaci Gd^{3+} pro další studium jako součást potenciální kontrastní látky a Eu^{3+} , Yb^{3+} , Tb^{3+} a Y^{3+} pro určení hydratačního čísla a provedení modelové „click reakce“. U všech uvedených lanthanoidů byl použit ke komplexaci acetát příslušného kovu v mírném nadbytku a reakční směs byla následně přechištěna na sloupci slabého kationtového měniče. Pro kompletní a rychlou komplexaci je vhodné zvýšit pH roztoku, ne však výše než na pH přibližně 6,5, aby nedocházelo k odchránění TMS a přesmyku. U ^{31}P NMR spekter komplexů jsou uvedeny v procentech integrální hodnoty píků, které odpovídají jednotlivým izomerům SA a TSA, případně P^* stereoizomerům vzniklým koordinací fosfinátového kyslíku k iontu lanthanoidu (přiřazeno dle lit.³³).

K syntéze komplementárního ligandu s azidovou funkční skupinou bylo využito dobře popsaného ligandu DO3AP^{ABn}, jehož syntéza je optimalizovaná a v naší laboratoři rutinně prováděná podle schématu níže.



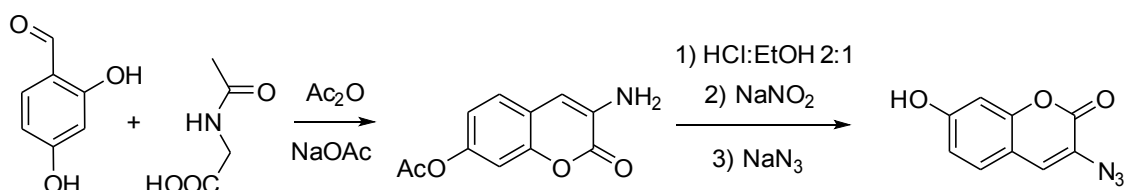
Primární aromatická skupina ligandu DO3AP^{ABn} může být použita ke konjugaci s cílovými molekulami přes thiokarbamátovou spojku^{34,35} nebo k reakci s aktivovanými karboxylovými aminokyselinami.

DO3AP^{ABn} byl připraven s celkovým výtěžkem 40 % z tBu₃DO3A po rekrystalizaci ze směsi *i*-PrOH/H₂O ve formě tetrahydrochloridu. Vázaný chlorovodík zajistil dostatečně kyselé prostředí pro diazotaci a reakcí s azidem došlo k zavedení azidové skupiny na aromatický kruh. Na silném aniontovém měniči jsou pak odstraněny kationty a produkt byl získán jako hydrochlorid. Stejně jako ostatní azidy (a aromatické azidy zvláště), je i produkt citlivý na světlo a jeho působením postupně tmavne.

Z ligandu (**14**) byly připraveny komplexy lanthanoidů Gd³⁺, Eu³⁺ a Tb³⁺. Oproti komplexům (**12**) není čištění na sloupci kationtového měniče vhodné, protože se z něj komplexy vymývají obtížně. Je však možné je čistit na silikagelu nebo neutrální Al₂O₃ se stejnou mobilní fází. Produkty fotodegradace zůstávají na začátku kolony.

Pro nalezení vhodných podmínek a ověření použitelnosti připravených komplexů pro konjugaci přes CuAAC byl jako azidový substrát zvolen 3-azido-7-kumarin. Jeho kumarinové jádro nevykazuje fluorescenci díky azidové skupině, která funguje jako zhášec. Po CuAAC reakci je však výsledný triazol zpravidla silně fluorescenční. Toho lze využít k měření rychlosti či stupně konverze reakce a optimalizaci podmínek.

3-azido-7-kumarin byl syntetizován z 2,4-dihydroxybenzaldehydu celkem třikrát podle lit.³⁶, která uvádí celkové výtěžky 54 %, pokaždé s výtěžky kolem 15 %. To odpovídá výsledkům uváděným v lit.³⁷ Tento azidokumarin na světle tmavne a snadno se rozkládá.



S gadolinitým komplexem (**12**) byla úspěšně v malém množství provedena modelová „click reakce“ s 3-azido-7-kumarinem za klasických podmínek s přidavkem cca 1 ekv. TBAF, který způsobil ochránění TMS skupiny *in situ*³⁸. V MS spektru nebyl pozorován žádný signál měďnatého komplexu s produktem CuAAC, což svědčí o vysoké stabilitě komplexu (**12**). Výsledný konjugát (**13**) je v roztoku silně fluorescenční. Teoreticky by mohl sloužit jako bimodální CA pro MRI a fluorescenční mikroskopii.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, všechny použité chemikálie byly v komerčně běžně dostupné kvalitě a to od firem Lachema, Fluka, Reachim Organics, Fischer Scientific a Sigma Aldrich v případě organických reagensů nebo firem Penta a Lach-Ner pro rozpouštědla a anorganická činidla.

Pokud není uvedeno jinak, je označením EtOH míněn 96% ethanol denaturovaný hexanem. Jako bezvodý EtOH byl použit komerční absolutní ethanol od firmy Penta. Pokud není uvedeno jinak, je NH_4OH míněn 25% vodný roztok amoniaku.

Bezvodá organická rozpouštědla byla sušena běžně užívanými metodami. Molekulárním sítem 0,4 nm (pyridin), varem s P_4O_{10} (MeCN , CH_2Cl_2) nebo varem se sodíkem a difenylketonem (THF, diethylether) a následnou destilací v atmosféře Ar.

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ byl rekrystalizován z vody a vysušen v exsikátoru s P_4O_{10} . Paraformaldehyd byl získán filtrací ze starších roztoků komerčního 37% roztoku formaldehydu.

$t\text{-Bu}_3\text{DO}_3\text{A}\cdot\text{HBr}$ byl syntetizován na zakázku firmou INTERPHARMA PRAHA, a.s.

Tetrahydrochlorid 10-({hydroxy[4-aminobenzyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny byl syntetizován postupem publikovaným v lit.³⁹

3-azido-7-hydroxykumarin byl připraven podle lit.³⁶

Pro sloupcovou a flash chromatografii byl použit silikagel 60 (63–100 μm) od firmy Merck. Automatizovaná flash chromatografie byla prováděna na přístroji systému Sepacore Büchi s chromatografickou patronou plněnou silikagelem 60 (40–63 μm) (12 g) a spektrometrickou detekcí při vlnové délce 254 nm.

4.2 Charakterizační metody

4.2.1 NMR

K charakterizaci látek bylo použito jednodimenziálních ^1H , ^{31}P a ^{13}C NMR spekter měřených na přístroji Varian VNMRs 300. Měření probíhalo při 25 °C, pokud není uvedeno jinak, a všechny hodnoty chemických posunů jsou vyjádřeny v ppm a interakční konstanty v Hz. Spektra byla referencována na vnitřní standard Me_4Si ($\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{C}} = 0,0$ ppm) pro CDCl_3 nebo t -butylalkohol ($\delta_{\text{H}} = 1,25$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 32,6$ ppm a 72,77 ppm) pro D_2O případně na píky rozpouštědla: CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,25$ ppm), CDCl_3 ($\delta_{\text{C}} = 77,2$ ppm), HDO ($\delta_{\text{H}} = 4,79$ ppm), CD_2HOD ($\delta_{\text{H}} = 3,31$ ppm), CD_3OD ($\delta_{\text{C}} = 49,0$ ppm), DMSO- d_5 ($\delta_{\text{H}} = 2,54$ ppm) a DMSO- d_6 ($\delta_{\text{C}} = 40,5$ ppm). ^{31}P spektra byla

měřena s vnějším standardem 85% H_3PO_4 v H_2O ($\delta_p = 0,0$ ppm) a při jejich měření byl většinou použit ^1H decoupling.

4.2.2 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

K chromatografii na tenké vrstvě byly použity fólie Silufol (Kavalier) nebo Merck 1.05554.

Použité mobilní soustavy a metody detekce jsou uvedeny u jednotlivých látek

K detekci na foliích Merck bylo použito zhášení fluorescence pod UV lampou při vlnové délce 254 nm. U derivátů aromatických azidů docházelo působením tohoto záření po dobu cca 3 minut k permanentnímu ztmavnutí skvrn.

Detekční činidla

Molybdenan ceričito-amonný (CAM) (0,5 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 12,0 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěno v 250 ml 10% H_2SO_4) především pro detekci fosfinátů, detekce provedena ponořením fólie do roztoku a zahříváním horkovzdušnou pistolí na cca 170 °C.

5% aq. roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pro detekci chelatujících ligandů, detekce provedena ponořením fólie do roztoku.

2% aq. roztok KMnO_4 (2,0 g KMnO_4 a 4,0 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml vody) pro nespecifickou detekci organických a redukujících látek, detekce provedena ponořením fólie do roztoku a opláchnutím horkou vodou.

4.2.3 MS

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 ES-ion trap s ionizací elektrosprejem v pozitivním i negativním módu. Jako rozpouštědlo byl použit MeOH v HPLC kvalitě. Uváděny jsou jen signály, které se podařilo interpretovat. Intenzita signálu je uvedena v procentech relativně k nejintenzivnějšímu signálu. U MS spekter lanthanoidů s více stabilními izotopy je uveden jen signál nejzastoupenějšího, přičemž intenzita MS signálů odpovídala přírodnímu zastoupení izotopů.

4.2.4 Luminiscence

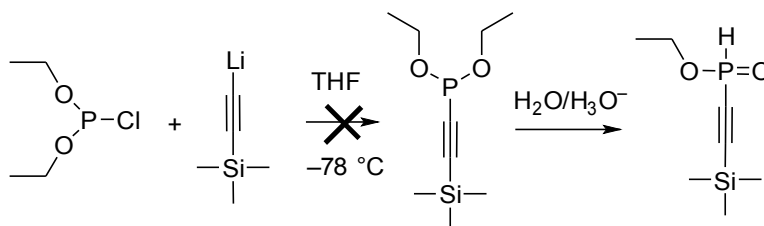
Měření luminiscence bylo provedeno na spektrofluorimetru Edinburgh Instruments FS900 s 450 W xenonovou výbojkou, mikrosekundovou výbojkou a fotonásobičem s vlnovým rozsahem 300–850 nm.

4.2.5 Elementární analýza

Elementární analýza (stanovení C, H, N, Cl) bylo provedeno servisním pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR.

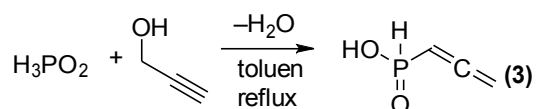
4.3 Syntézy

Pokus o přípravu trimethylsilylethynylfosfinové kyseliny (1)



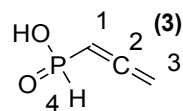
Do 100ml Schlenkovy baňky vyžíhané za přívodu argonu a opatřené míchadlem a septem s malou promývačkou naplněnou nujolem byl pod proudem argonu odměřen čerstvě vysušený THF (35 ml), baňka byla vložena do lázně pevný CO₂ – EtOH a po ochlazení na –78 °C byl přidán 0,5M roztok trimethylsilylacetilidu lithného v THF (5,0 ml; 2,5 mmol). Během 15 minut byl injekční stříkačkou přidán roztok diethylchlorfosfitu (391 mg; 2,5 mmol) v suchém THF (10 ml). Reakční směs byla ponechána v lázni dosáhnout LT. Po 4 h byla reakce ukončena přidáním suchého EtOH (10 ml). Reakční směs byla následně odpařena na RVO. Odparek pak byl rozpuštěn v 3% aq. HCl (5 ml) a třikrát extrahován CH₂Cl₂ (5 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (5 ml) a vysušeny Na₂SO₄. Po odpaření roztoku na RVO bylo získáno 180 mg žluto-hnědého oleje. Změřením NMR a MS spekter bylo zjištěno, že látka neposkytuje ¹H signál charakteristický pro TMS a poskytuje velké množství ³¹P signálů s interakční konstantou charakteristickou pro P–H vazbu. V MS spektrech pak bylo nalezeno velké množství signálů v oblasti od 400 do 700 hmotnostních jednotek.

Prop-1,2-dienylfosfinová kyselina (3)



Látka (3) byla připravena postupem převzatým z lit.²⁰. Do 100ml Schlenkovy baňky byla odvážena 50% aq. H₃PO₂ (6,60 g; 50 mmol) a na RVO byla při 30 °C odpařována do konstantní hmotnosti. Poté byl přidán benzen (50 ml) a prop-2-ynylalkohol (5,60 g; 100 mmol), baňka byla opatřena Dean-Starkovou pastí s chladičem a s malou promývačkou naplněnou nujolem a reakční směs byla zahřívána v atmosféře argonu k refluxu za současného azeotropického odstraňování vody. Po 8 h, když se již žádná voda neuvolňovala, bylo zahřívání ukončeno. Směs byla odpařena na RVO a získaná nažloutlá kapalina byla třikrát promyta diethyletherem (10 ml) a zbylý produkt byl vysušen ve vakuu. Bylo získáno 4,88 g (3) (94 % teorie).

Charakterizace:



Charakterizace se shodovala s lit.²⁰

TLC: THF:HNEt₂:H₂O (10:6:2), $R_f = 0,45$, roztok KMnO₄ nebo CAM

¹H NMR (299,94 MHz, D₂O): δ 4,95 (dd, $^4J_{HP} = 12,9$, $^2J_{HH} = 6,9$, 2H, H-3); 5,37 (m, 1H, H-1); 7,02 (d, $^1J_{HP} = 548$, 1H, H-4)

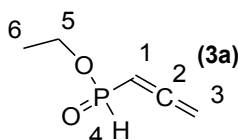
¹³C NMR (75,43 MHz, D₂O): δ 78,8 (d, $^3J_{CP} = 14,9$, C-1); 85,6 (d, $^1J_{CP} = 129,4$, C-1); 216,5 (s, C-2)

³¹P NMR (121,42 MHz, D₂O): 14,8 (dtd, $^1J_{HP} = 548$, $^4J_{HP} = 12,9$, $^2J_{HP} = 3,4$)

Ethyl prop-1,2-dienylfosfinát (3a)

Ethylester (3a) byl připraven stejným způsobem jako ethylester (8a). Z (3) (4,54 g; 43,64 mmol) bylo reakcí s ethylchloroformiátem (4,71g; 43,64 mmol) připraveno 4,69 g ethylesteru (3a) (81% teorie) jako nažloutlé příjemně vonící kapaliny.

Charakterizace:

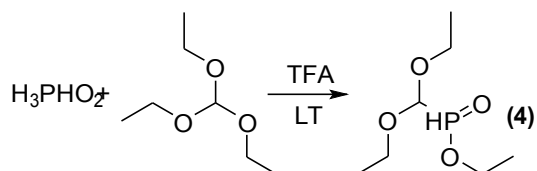


¹H NMR (299,94 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (t, $^3J_{HH} = 7,2$, 3H, H-6); 4,07 (ddd, $J_{HP} = 13,0$, $^3J_{HH} = 7,2$, $^4J_{HH} = 2,1$, 2H, H-5); 5,03 (dd, $^4J_{HP} = 13,2$, $^4J_{HH} = 6,9$, 2H, H-1); 5,36 (tdd, $^4J_{HH} = 6,9$, $^3J_{HP} = 3,3$, $^3J_{HH} = 2,2$, 1H, H-3); 7,16 (dd, $^1J_{HP} = 583,0$, $^4J_{HH} = 2,2$, 1H, H-4)

¹³C NMR (75,43 MHz, CDCl₃): δ 16,2 (d, $^3J_{CP} = 6,1$, C-6); 62,0 (d, $^2J_{CP} = 6,6$, C-5); 77,1 (d, $^3J_{CP} = 15,5$, C-1); 82,5 (d, $^2J_{CP} = 133,3$, C-3); 214,7 (s, C-2)

³¹P NMR (121,42 MHz, CDCl₃): 20,1 (ddd, $^1J_{HP} = 583,0$; $^4J_{HP} = 13,2$, $^3J_{HP} = 13,0$)

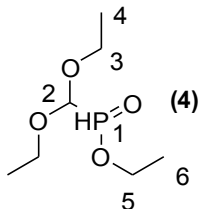
Ethyl (diethoxymethyl)fosfinát (4)



Ethyl (diethoxymethyl)fosfinát (4) byl připraven podle postupu popsáném v lit.²⁵. Do 100ml baňky byla odvážena krystalická kyselina fosforená (5,00 g; 75,8 mmol), kyselina trifluoroctová (1,73 g; 15,2 mmol) a triethylorthoformiát (24,70 g; 167 mmol) a směs byla nechána za míchání 8 h

reagovat za LT. Následně byla reakční směs odpařena na RVO, výsledný olej byl rozpouštěn v CHCl_3 (40 ml) a třikrát extrahován nasyceným roztokem NaHCO_3 (30 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Odparek byl destilován na aparatuře Kugelrohr při teplotě 70°C a tlaku 1,0 mbar. Bylo získáno 12,3 g (83 % teorie) produktu **(4)** ve formě bezbarvé kapaliny.

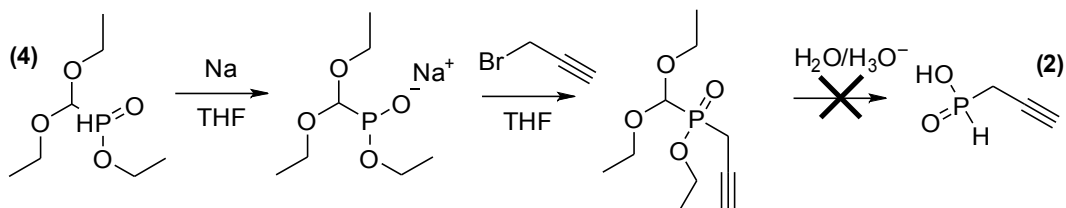
Charakterizace:



^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ 1,21 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$, 6H, C-4); 1,32 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$, 3H, C-6); 3,67 (m, 4H, H-3); 4,17 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$, 2H, H-5); 4,64 (d, $^2J_{\text{PH}} = 8,5$, 1H, H-2); 6,91 (d, $^1J_{\text{PH}} = 556,0$, 1H, H-1)
 ^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ 15,6 (s, C-6); 16,7 (s, C-4); 62,4 (s, C-3); 66,2 (s, C-5); 101,2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 153,1$, C-2)

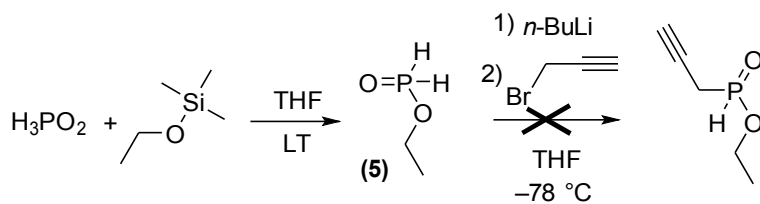
^{31}P NMR (121,42 MHz, CDCl_3): δ 28,0 (dd, $^1J_{\text{PH}} = 555,8$, $^2J_{\text{PH}} = 8,5$)

Pokus o přípravu **(2)** přes **(4)**



V 50 ml tříhrdlé baňce opatřené přívodem argonu, malou promývačkou naplněnou nujolem a septem byl rozpouštěn fosfinát **(4)** (2,94 g; 15 mmol) v suchém THF (28 ml). Pod argonem byl vložen nadbytek očištěného sodíku (cca 4 g) a reakce provázená vývojem vodíku byla ponechána probíhat 6 h za LT. Když naměřené ^{31}P NMR spektrum prokázalo kompletní konverzi **(2)** na sodnou sůl ($\delta = 162$ ppm), byl zbylý sodík vyjmut a do reakční směsi byl během 15 minut přikapán přes septum 80% roztok 3-brom-1-propynu v toluenu (2,23 g; 15 mmol), přičemž se směs barvila hnědo-oranžově. Reakce byla ponechána probíhat za LT přes noc. Následně byla směs odpařena na RVO, odparek rozpouštěn v CH_2Cl_2 (20 ml) a roztok dvakrát extrahován nasyceným roztokem NaHCO_3 (20 ml). Spojené organické fáze byly vysušeny MgSO_4 a odpařeny na RVO, čímž bylo získáno 2,47 g světle hnědého oleje. Podle ^{31}P a ^1H spekter produkt obsahoval kromě příslušného prop-2-ynyl fosfinátu také asi 25 % prop-1,2-dienylového izomeru. Tato směs byla použita k pokusům o hydrolyzu. Byl vyzkoušen reflux v 12M HCl , 6M HCl , 10% aq. H_2SO_4 a CF_3COOH , ale žádná z metod nevedla k požadovanému produktu **(2)**.

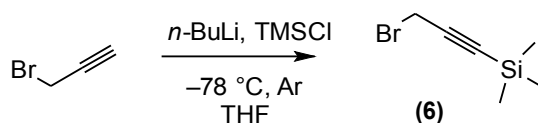
Pokus o přípravu ethylesteru (2) alkylací ethylfosfinátu (5)



Ethylfosfinát (5) byl připraven postupem uvedeným v lit.⁴⁰. Protože se snadno rozkládá, byl použit ihned po přípravě do další reakce bez předchozího čištění. V 50ml Schlenkové baňce opatřené míchadlem, septem a přívodem argonu byla v suchém THF (2 ml) rozpuštěna krystalická H_3PO_2 (1,00 g; 15,2 mmol). Pod argonem byl přes septum pomalu přidán Me_3SiOEt (5,0 ml; 42,6 mmol) a směs byla ponechána reagovat 2 h za laboratorní teploty. Od reakční směsi bylo změřeno ^{31}P spektrum, které ukázalo 97% konverzi H_2PO_3 na ethylfosfinát (5). Baňka s reakční směsí byla umístěna do chladicí lázně ze směsi EtOH a pevného CO_2 a přes septum byl pod argonem přidán suchý THF (7 ml) a 80% roztok 3-brom-1-propynu v toluenu (2,37 g; 16,0 mmol). Poté bylo během 10 minut přidán 2,5M roztok n -butyllithia v hexanech (7,3 ml; 18,3 mmol.) za žluto-hnědého zbarvení směsi. Směs byla ponechána pod argonem 2 h reagovat a dosáhnout laboratorní teploty. Následně bylo do směsi přilít nasycený roztok NH_4Cl (15 ml), směs byla rozdělena v dělicí nálevce a vodná fáze třikrát extrahována CH_2Cl_2 (10 ml). Organické fáze byly spojeny a po vysušení Na_2SO_4 odpařeny na RVO do hnědého oleje. Změřené ^{31}P NMR spektrum ukázalo, že se jedná o pestré směs mnoha látek.

Pokus o alkylaci ethylfosfinátu 3-brom-1-propynem byl proveden podobným způsobem ještě několikrát při LT a delších reakčních časech za použití slabších bází: DIPEA, pyridinu, MeONa a Et_3N . Žádná z reakcí však nevedla k požadovanému produktu (2).

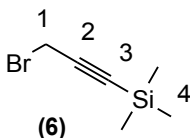
3-Brom-1-(trimethylsilyl)-1-propyn (6)



Do 250ml baňky opatřené septem a umístěné v chladicí lázni ze směsi EtOH a pevného CO_2 bylo pod argonem odměřeno bezvodý THF (125 ml). Za míchání bylo injekční stříkačkou přidán 80% roztok 3-brom-1-propynu (propargylbromidu) v toluenu (5,0 g; 33,6 mmol) a následně 2M roztok n -butyllithia v cyklohexanu (16,8 ml; 33,6 mmol). Směs byla ponechána 10 minut reagovat a poté k ní byl po kapkách během 5 minut přidán trimethylsilylchlorid (3,65 g; 33,6 mmol). Směs byla ponechána pod argonem 4 h reagovat a dosáhnout laboratorní teploty. Následně byl do směsi přilít nasycený roztok NH_4Cl (75 ml), směs byla rozdělena v dělicí nálevce a vodná fáze třikrát

extrahována CH_2Cl_2 (30 ml). Spojené organické fáze byly odbarveny aktivním uhlím a vysušeny Na_2SO_4 . Po filtraci byl roztok odpařen na RVO při $40\text{ }^\circ\text{C}$ a získaný produkt chromatograficky separován na koloně s náplní silikagelu (200 g). Jako mobilní fáze byl použit hexan. Frakce s předpokládaným produktem byly odpařeny na RVO a produkt získán ve formě bezbarvé aromatické kapaliny. Výtěžek 4,05 g (63 % teorie).

Charakterizace:



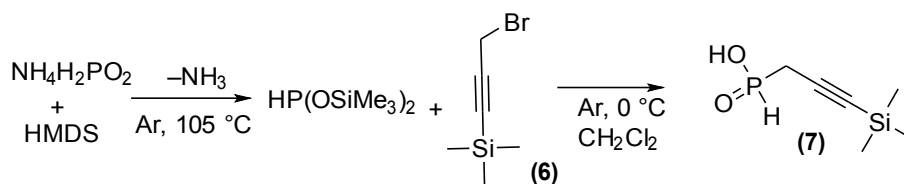
Charakterizace se shoduje s daty uvedenými v literatuře.³⁰

TLC: hexan, $R_f = 0,70$, roztok KMnO_4 .

^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ 0,18 (s, 9H, H-4); 3,91 (s, 2H, H-1)

^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ -0,4 (s, C-4); 14,6 (s, C-1); 92,3 (s, C-3); 100,0 (s, C-2)

3-(Trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinová kyselina (7)

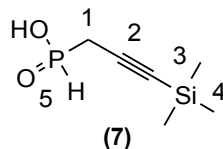


V 50ml tříhrdlé baňce opatřené přívodem argonu zpětným chladičem s malou promývačkou naplněnou nujolem a septem byl třikrát sekurován $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (5,0 g; 60 mmol). Poté bylo pod argonem přidán přes septum HMDS (15 ml; 72 mmol), septum bylo nahrazeno skleněnou zátkou a reakční směs zahřívána pod mírným proudem argonu za míchání na $105\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 12 h. Během reakce se $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ rozpustil za vzniku bezbarvého roztoku a vývoje amoniaku. Poté byla reakční směs ochlazená nejprve na pokojovou teplotu a následně na $-10\text{ }^\circ\text{C}$ v lázni voda - led - NaCl. Poté byla směs zředěna suchým CH_2Cl_2 (30 ml) a následně pomalu pod argonem přidán bromid (6) (3,1 g; 16,2 mmol). Směs byla ponechána dosáhnout laboratorní teploty a 24 h reagovat, přičemž se bíle zakalila. Reakce byla ukončena přidavkem absolutního EtOH (10 ml) a směs byla odpařena na RVO. Odparek byl 2× rozpuštěn a znovu odpařen s absolutním EtOH (5 ml). Následně byl produkt rozpuštěn v CHCl_3 (20 ml) a dvakrát rychle promyt 3% roztokem HCl (20 ml). Spojené vodné fáze byly extrahovány CHCl_3 (20 ml). Spojené organické fáze byly vysušeny Na_2SO_4 a odpařeny na RVO při $50\text{ }^\circ\text{C}$, čímž byl získán produkt (7) ve formě hustého bezbarvého oleje. Výtěžek 1,54 g (54 % teorie v přepočtu na bromid (6)).

Takto získaný produkt obsahuje asi 3% bis(3-(trimethylsilyl)prop-2-ynyl)fosfinové kyseliny (7a),

kteřou je možné separovat chromatografií na silikagelu mobilní soustavou ethylacetát : MeOH (10:8) ($R_f = 0,75$) a po odpaření rozpouštědla vysrážet přidáním MeCN čistou látku **(7)** ($R_f = 0,50$) ve formě bílého prášku. Pro účely další syntézy ve větším měřítku však nebyla tato separace provedena, neboť v dalším kroku kyselina **(7a)** nereaguje a je odstraněna při čištění.

Charakterizace:



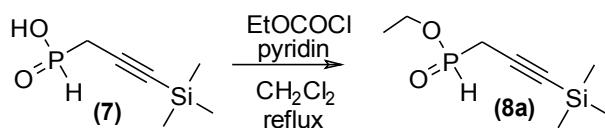
TLC : ethylacetát:MeOH (10:8), $R_f = 0,50$, roztok KMnO_4 nebo CAM

^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ 0,17 (s, 9H, H-4); 2,83 (dd, $^2J_{\text{HP}} = 20,1$, $^3J_{\text{HH}} = 1,8$, 2H, H-1); 7,11 (d, $^1J_{\text{HP}} = 584$, 1H, H-5); 10,9 (bs, OH)

^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ -0,1 (s, C-4); 24,6 (d, $^1J_{\text{CP}} = 84,5$, C-1); 86,8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7,5$, C-3); 99,4 (d, $^2J_{\text{CP}} = 8,7$, C-2)

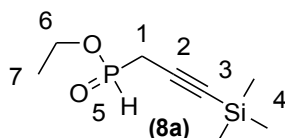
^{31}P NMR (121,42 MHz, CDCl_3): 27,8 (dt, $^1J_{\text{HP}} = 584$, $^2J_{\text{HP}} = 20,0$)

Ethyl 3-(trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinát (8a)



Do 100ml baňky byla odvážena kyselina **(7)** (0,76 g; 4,31 mmol) ve formě oleje vysušené trojnásobným odpařením s absolutním EtOH (5 ml) na RVO. Poté byl přidán suchý CH_2Cl_2 (19 ml) a ethylchloroformiát (0,47 g; 4,31 mmol). Za míchání byl při laboratorní teplotě do směsi pomalu přikapán suchý pyridin (0,35 g; 4,31 mmol), přičemž se uvolňoval CO_2 . Po pěti minutách byla baňka opatřena zpětným chladičem a směs byla zahřívána k refluxu po 15 minut. Poté byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu a třikrát promyta 3% roztokem HCl (20 ml) a jednou nasyceným roztokem NaCl (20 ml). Spojené vodné podíly byly dvakrát extrahovány CH_2Cl_2 (20 ml). Spojené organické fáze byly vysušeny Na_2SO_4 a odpařeny na RVO při 50 °C, čímž byl získán produkt **(8a)** ve formě bezbarvé příjemně vonící kapaliny. Výtěžek 0,86 g (98 % teorie).

Charakterizace:



TLC: ethylacetát:MeOH (10:8), $R_f = 0,50$, roztok KMnO_4 nebo CAM

^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ 0,13 (s, 9H, H-4); 2,83 (dd, $^2J_{\text{HP}} = 20,1$, $^3J_{\text{HH}} = 1,8$, 2H, H-1); 7,11

(d, $^1J_{\text{HP}} = 584$, 1H, H-5); 4,24-4,09 (m, 2H, H-6); 1,36 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$, 3H, H-7)

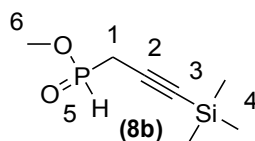
^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ -0,2 (s, C-4); 16,2 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6,0$, C-7); 22,3 (d, $^1J_{\text{CP}} = 91,2$, C-1); 63,1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7,2$, C-6); 89,9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8,8$, C-3); 93,8 (d, $^2J_{\text{CP}} = 11,1$, C-2)

^{31}P NMR (121,42 MHz, CDCl_3): 29,0 (dt., $^1J_{\text{HP}} = 569,8$, $^2J_{\text{HP}} = 20,0$, $^3J_{\text{HP}} = 10,0$)

Methyl 3-(trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinát (8b)

Methylester (**8b**) byl připraven analogickým postupem jako ethylester (**8a**). Z kyseliny (**7**) (1,64 g; 9,31 mmol) bylo reakcí s methylchloroformiátem (0,88 g; 9,31 mmol) připraveno 1,72 g methylesteru (**8b**) (97 % teorie) jako bezbarvé příjemně vonící kapaliny.

Charakterizace:



^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ 0,12 (s, 9H, H-4); 2,81 (d, $^2J_{\text{HP}} = 18,9$, 2H, H-1); 3,81 (d, $^3J_{\text{HP}} = 12,0$, 3H, H-6); 7,16 (d, $^1J_{\text{HP}} = 585$, 1H, H-5)

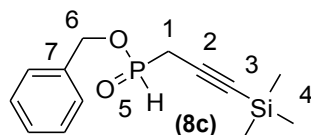
^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ 0,3 (s, C-4), 21,9 (d, $^1J_{\text{CP}} = 91,3$, C-1); 53,1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7,2$, C-6); 89,9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8,5$, C-3); 93,4 (d, $^2J_{\text{CP}} = 10,9$, C-2)

^{31}P NMR (121,42 MHz, CDCl_3): 31,5 (bd, $^1J_{\text{HP}} = 571,3$)

Benzyl 3-(trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinát (8c)

Benzylester (**8c**) byl připraven analogickým postupem jako ethylester (**8a**). Z kyseliny (**7**) (200 mg; 1,13 mmol) bylo reakcí s benzylchloroformiátem (193 mg; 1,13 mmol) připraveno 290 mg benzylesteru (**8c**) (96 % teorie) jako bezbarvé příjemně vonící kapaliny.

Charakterizace:

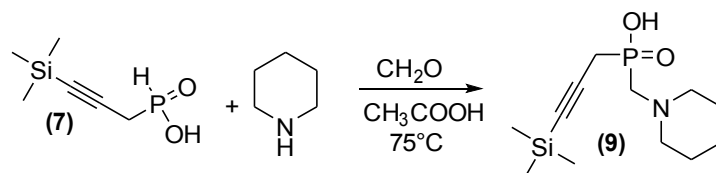


^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ 0,14 (s, 9H, H-4); 2,82 (d, $^2J_{\text{HP}} = 20,7$, 2H, H-1); 5,14 (m; 2H, H-6); 7,13 (d, $^1J_{\text{HP}} = 567$, 1H, H-5); 7,36 (m, 5H, arom.)

^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ -0,3 (s, C-4); 22,2 (d, $^1J_{\text{CP}} = 90,7$, C-1); 68,0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6,8$, C-6); 90,4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8,7$, C-3); 93,5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 11,1$, C-2); 128,6-128,2 (m, arom.); 135,1 (s, 7)

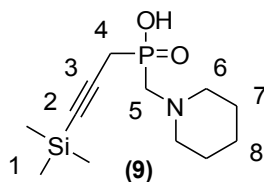
^{31}P NMR (121,42 MHz, CDCl_3): 29,1 (bd, $^1J_{\text{HP}} = 570$)

(Piperidin-*N*-methyl)-3-(trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinová kyselina (9)



V 4ml vialce byl v kyselině octové (0,5 ml) rozpuštěn piperidin (9,1 mg; 0,107 mmol), kyseliny (7) (21,3 mg; 0,118 mmol) a paraformaldehyd (7,2 mg; 0,241 mmol). Vialka byla opatřena víčkem a magnetickým míchadlem a reakční směs zahřívána po 16 h na 75 °C. Po této době byl odebrán vzorek a změřeno ^{31}P NMR spektrum. Protože 95 % kyseliny (7) odreagovalo na jediný produkt, byla reakce ukončena a směs odpařena na RVO při 60 °C. Následně byla reakční směs ještě třikrát odpařena s vodou (1 ml) kvůli odstranění zbytků CH_2O a kyseliny octové. Protože se jednalo pouze o modelovou reakci, nebyl produkt dále purifikován. Bylo získáno 30 mg špinavě bílé pevné látky.

Charakterizace:



^1H NMR (299,94 MHz, D_2O): δ 0,08 (s, 9H, H-1), 1,69 (m, 4H, H-7); 1,97 (p, $^3J_{\text{HH}} = 3,6$, 2H, H-8); 2,64 (d, $^2J_{\text{HP}} = 18,3$, 2H, H-4); 3,05 (m, 4H, H-6); 3,25 (d, $^2J_{\text{HP}} = 12,9$, 2H, H-5)

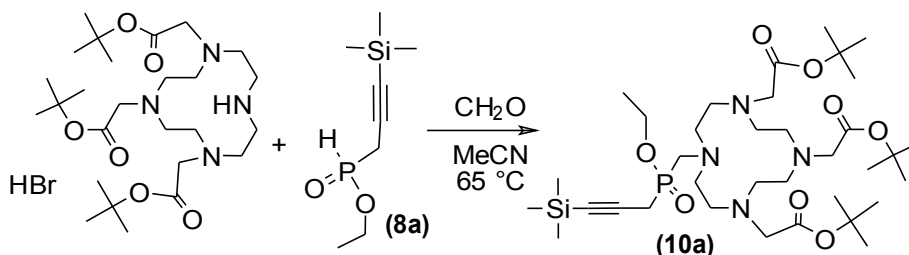
^{13}C NMR (75,43 MHz, D_2O): δ -0,1 (s, C-1); 21,2 (s, C-8); 22,8 (s, C-7); 24,5 (d, $^1J_{\text{CP}} = 94,5$, C-4); 45,1 (s, C-6); 54,6 (d, $^1J_{\text{CP}} = 90,7$, C-5); 89,6 (s, $^3J_{\text{CP}} = 7,1$, C-2); 100,2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 10,5$, C-3)

^{31}P NMR (121,42 MHz, D_2O): 22,9 (dt, $^2J_{\text{HP}} = 20,0$)

MS(+): 295,8 (100[$\text{M}+\text{Na}^+$]); 569,1(60[$2\text{M}+\text{Na}^+$])

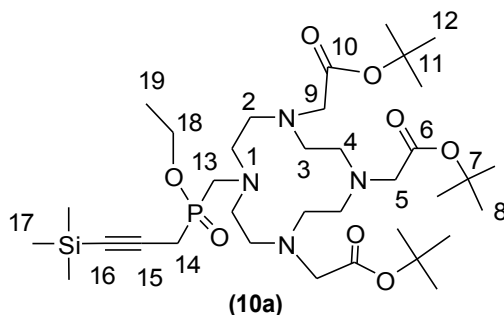
MS(-): 271,6 (100[$\text{M}-\text{H}^-$]); 544,8 (92[$2\text{M}-2\text{H}^-$])

Ethyl ({4,7,10-tris[(*tert*-butyloxykarbonyl)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1-yl}methyl)-3-(trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinát (10a)



Do 25ml baňky byl odvážen *t*-Bu₃DO3A·HBr (1,000 g; 1,679 mmol), (380 mg; 1,847 mmol) ethylesteru (**8a**) a paraformaldehyd (56 mg; 1,85 mmol). Dále byl přidán suchý acetonitril (10 ml) a baňka byla opatřena magnetickým míchadlem a zátkou. Reakční směs byla za míchání zahřívána v olejové lázni na 65 °C a průběh reakce sledován měřením ³¹P NMR spekter každých 12 hodin. Docházelo k úbytku dubletu esteru (**8a**) kolem 30 ppm a nárůstu singletu produktu (**10a**) u 43 ppm. Kromě toho vzniklo přibližně 3 % kyseliny (**7**) a vzhled reakční směsi přešel z bílé suspenze paraformaldehydu do podoby žluto-hnědého čirého roztoku. Po 3 dnech zreagovalo více než 95 % esteru (**8a**) a reakce byla ukončena odpařením na RVO. Odparek v podobě světle-hnědého oleje byl rozpuštěn v minimálním množství horkého MeOH, ochlazen a produkt vysrážen přidavkem diethyletheru. Zfiltrováním přes fritu S3 a promytím malým množstvím diethyletheru bylo po vysušení získáno 1,163 g látky (**10a**) ve formě špinavě bílého prášku.

Charakterizace:



TLC: EtOAc:EtOH:NH₄OH (60:33:7), *R_f* = 0,75, roztok KMnO₄ nebo CAM

¹H NMR (299,94 MHz, CD₃OD): δ 0,02 (s, 9H, H-17); 1,19 (t, ³*J*_{HH} = 6,9; 3H, H-19); 1,28 (s; 9H, H-8); 1,31 (s; 18H, H-12); 2,60–3,90 (m, 26H, H-1-5, H-9, H-13, H-14, H-22); 4,20 (p, ³*J*_{HH} = 6,9, ³*J*_{HP} = 7,0, 2H, H-18)

¹³C NMR (75,43 MHz, CDCl₃): δ 0,2 (s, C-17); 17,0 (d, ³*J*_{CP} = 5,6; C-19); 21,5 (d, ¹*J*_{CP} = 85,2; C-14); 28,6 (s, C-12); 28,8 (s, C-8); 50,7 (s, C-2); 51,3 (s, C-1,3); 51,6 (d, ²*J*_{CP} = 98,2, C-13); 53,3 (s, C-4); 55,2 (s, C-9); 56,5 (s, C-5); 63,8 (d, ²*J*_{CP} = 7,2, C-18); 83,5 (s, C-15); 84,0 (s, C-11); 91,3 (d, ³*J*_{CP} = 9,1, C-16); 97,8 (d, ²*J*_{CP} = 14,3, C-15); 169,5 (s, C-6); 173,3 (s, C-10)

^{31}P NMR (121,42 MHz, CD_3OD): 46,8 (bs)

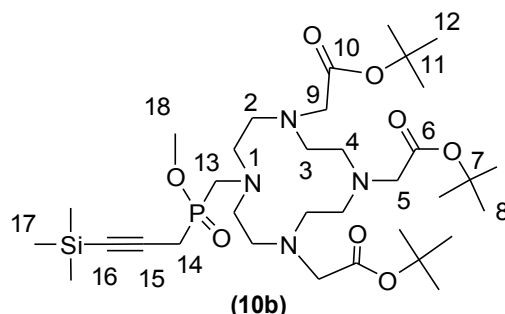
MS(+): 731,5 ($51[\text{M}]^+$); 753,4 ($100[\text{M}+\text{Na}]^+$)

MS(-): 701,3 [$\text{M}-\text{EtOH}]^-$

Methyl ({4,7,10-tris[(*tert*-butyloxykarbonyl)methyl]-1,4,7,10-tetraaza-cyklododekan-1-yl}methyl)-3-(trimethylsilyl)prop-2-ynylfosfinát (10b)

Látka (**10b**) byla připravena z methylesteru (**8b**) stejným postupem jako (**10a**) z ethylesteru. Z *t*-Bu₃DO3A·HBr (1,000 g; 1,679 mmol), methylesteru (**8b**) (336 mg; 1,763 mmol) a paraformaldehydu (53 mg; 1,763 mmol) bylo připraveno 1,095 mg látky (**10b**) jako špinavě bílého prášku.

Charakterizace:



TLC: EtOAc:EtOH:NH₄OH (60:33:7), $R_f = 0,70$, roztok KMnO₄

^1H NMR (299,94 MHz, CDCl_3): δ 0,07 (s, 9H, H-17); 1,40 (bs, 27H, H-8, H-12); 2,62 (d, $^2J_{\text{HP}} = 18,3$, 2H, H-13); 2,60–3,60 (m, 24H, H-1-5, H-9, H-14); 3,75 (d, $^3J_{\text{PH}} = 10,8$, 3H, H-18)

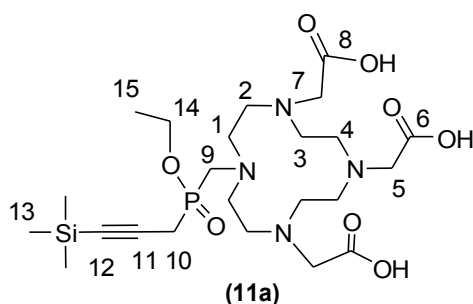
^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ 0,1 (s, C-17); 23,2 (d, $^1J_{\text{CP}} = 84,8$, C-14); 29,4 (s, C-12); 30,6 (s, C-8); 51,2 (s, C-2); 51,8 (s, C-1,3); 52,2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 97,8$, C-13); 53,8 (s, C-4); 54,9 (s, C-9); 56,3 (s, C-5); 58,3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7,2$, C-18); 84,6 (s, C-7); 86,1 (s, C-11); 92,1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8,9$, C-16); 98,3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12,1$, C-15); 170,2 (s, C-6); 174,2 (s, C-10)

^{31}P NMR (121,42 MHz, CD_3OD): 44,3 (bs)

10-({Ethoxy[3-(trimethylsilyl)prop-2-ynyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyklododekan-1,4,7- trioctová kyselina (11a)

V 25ml baňce byla rozpuštěna látka (**10a**) (1,1163 g; 1,589 mmol) v 85% kyselině mravenčí (10 ml). Baňka byla opatřena magnetickým míchadlem a zátkou a reakční směs byla za míchání zahřívána v olejové lázni na 65 °C po 4 dny. Poté byla reakční směs odpařena na RVO a odparek zbaven zbytků kyseliny mravenčí trojnásobným odpařením s vodou (5 ml). Takto získaný světle hnědý olej byl rozpuštěn v minimálním množství horkého MeOH, ochlazen a produkt vysrážen přidávkem diethyletheru. Zfiltrováním přes fritu S3 a promytím malým množstvím diethyletheru bylo po vysušení ve vakuu získáno 840 mg kyseliny (**11a**) ve formě hygroskopického bílého prášku.

Charakterizace:



TLC: EtOH:10% aq. AcOH (8:2), $R_f = 0,40$, roztok KMnO_4 , roztok CuSO_4

TLC: EtOAc:EtOH: NH_4OH (60:33:7), $R_f = 0,10$, roztok KMnO_4 , roztok CuSO_4

^1H NMR (299,94 MHz, CD_3OD): δ 0,05 (s, 9H, H-13); 1,20 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$, 3H, H-15); 2,60–3,90 (m, 26H, H-1-5, H-7, H-9, H-10); 4,15 (p, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$, $^3J_{\text{HP}} = 7,0$, 2H, H-15)

^{13}C NMR (75,43 MHz, CDCl_3): δ 0,3 (s, C-13), 17,5 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5,6$, C-15); 21,8 (d, $^1J_{\text{CP}} = 80,7$, C-10); 49,3 (s, C-2); 50,6 (s, C-1, C-3); 50,7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 97,0$, C-9); 53,4 (s, C-4); 54,4 (s, C-7); 54,6 (s, C-5); 65,0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7,2$, C-14); 92,0 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8,8$, C-12); 98,0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12,2$, C-11); 170,7 (s, C-6); 176,0 (s, C-8)

^{31}P NMR (121,42 MHz, CD_3OD): 50,4 (s)

MS(+): 601,2 (100[M+K-H] $^+$); 623,2 (62[M+Na+K-H] $^+$); 639,1 (45[M+2K-H] $^+$)

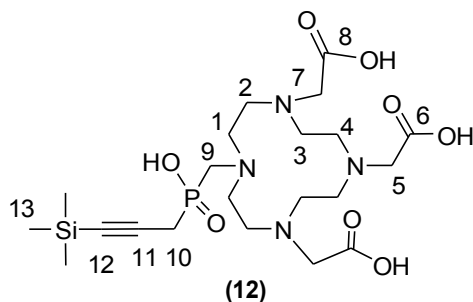
MS(-): 599,0 [M+K-2H] $^-$

10-({Hydroxy[3-(trimethylsilyl)prop-2-ynyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyklododekan-1,4,7- trioctová kyselina (12)

V 25ml baňce byla rozpuštěna látka (**10b**) (1,000 g; 1,395 mmol) v 85% kyselině mravenčí (10 ml). Baňka byla opatřena magnetickým míchadlem a zátkou a reakční směs byla za míchání zahřívána v olejové lázni na 65 °C po 4 dny. Poté byla reakční směs odpařena na RVO a odparek

zbaven zbytků kyseliny mravenčí trojnásobným odpařením s vodou (5 ml). Následně byl získaný světle hnědý olej rozpuštěn v 1,5 % aq. HCl (10 ml) a ponechán za míchání hydrolyzovat při LT přes noc. Následně byla reakční směs odpařena na RVO, odparek rozpuštěn v minimálním množství horkého MeOH, ochlazen a produkt vysrážen přidávkou diethyletheru. Zfiltrováním přes fritu S3 a promytím malým množstvím diethyletheru bylo po vysušení ve vakuu a následné třítýdenní ekvilibraci na vzduchu získáno 694 mg (1,093 mmol) kyseliny **(12)** ve formě světle hnědého prášku.

Charakterizace:



TLC: EtOH:10% aq. AcOH (8:2), $R_f = 0,40$, roztok KMnO_4 , roztok CuSO_4

TLC: EtOAc:EtOH: NH_4OH (60:33:7), $R_f = 0,10$, roztok KMnO_4 , roztok CuSO_4

^1H NMR (299,94 MHz, D_2O): δ 0,07 (s, 9H, H-13), 2,64 (t, $^2J_{\text{PH}} = 18,6$; 2H, H-10) 2,75-3,95 (bm, 24H; H-1-5, H-7, H-9)

^{13}C NMR (75,43 MHz, D_2O): δ 1,5 (s, C-13); 26,5 (d, $^1J_{\text{CP}} = 91,7$; C-10); 50,5 (s, C-2); 51,6 (s, C-1,3); 51,8 (d, $^2J_{\text{CP}} = 98,3$; C-9); 53,4 (s, C-4); 54,3 (s, C-7); 55,7 (s, C-5); 91,3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7,2$, C-12); 102,8 (d, $^2J_{\text{CP}} = 10,5$; C-11); 172,2 (s, C-6); 177,1 (s, C-8)

^{31}P NMR (121,42 MHz, D_2O): 21,0-26,5 (br s)

EA: $(12) \cdot 2\text{HCl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ výpočet: C 39,76; H 6,99; N 8,83; Cl 11,18; nalezeno: C 40,03; H 7,02; N 8,64; Cl 11,23

MS(+): 535,1 (51[M+H]⁺); 557,1 (100[M+Na]⁺); 557,1 (50[M+K]⁺)

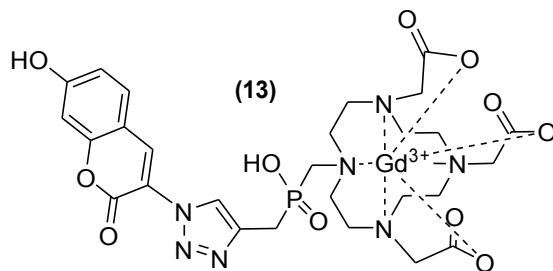
MS(-): 532,9 (100[M-H]⁻); 546,9 (12[M+Me-H]⁺); 570,9 (21[M+K-H]⁺)

Vzorová CuAAC reakce mezi $\text{H}[\text{Gd}(12)]$ a 3-azido-7-hydroxykumarinem

V 10 ml baňce byl komplex $\text{H}[\text{Gd}(12)]$ (84 mg) rozpuštěn ve směsi voda / isopropanol 1:1 (3 ml) spolu s 3-azido-7-hydroxykumarinem (50 mg; 240 μmol). Roztok byl probubláván po 3 minuty argonem, následně byl do roztoku za míchání přidán 1M vodný roztok TBAF (130 μl ; 130 μmol), 1M vodný roztok askorbátu sodného (61 μl ; 61 μmol) a 1M vodný roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6 μl ; 6 μmol). Reakční směs byla krátce probublána argonem a baňka vzduchotěsně uzavřena, reakce

byla ponechána probíhat v temnu při LT. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě po 24 h byla reakce ukončena reakční směs odpařena na RVO. Produkt byl separován chromatografií na silice (50 g) v soustavě 7% AcONH₄ v H₂O:*i*-PrOH (7:10) frakce s fluorescenčním produktem byly spojeny a odpařeny na RVO. AcONH₄ byl z odparku odstraněn sublimací za vysokého vakua (cca 10⁻² mbar) při 40 °C. Bylo získáno 110 mg produktu ve formě žluto-zeleného prášku, který ve vodném roztoku vykazuje silnou modrou fluorescenci pod UV zářením (366 nm). Kvůli vysoké paramagnetičnosti Gd³⁺ nebyla od tohoto komplexu měřena NMR spektra.

Charakterizace:



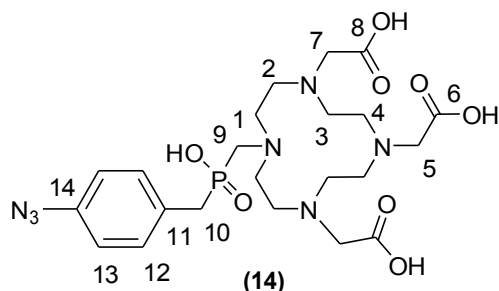
TLC: 7% AcONH₄ v H₂O:*i*-PrOH (7:10) *R*_f = 0,2, UV, roztok KMnO₄

MS(–): 818,8 (100[M–H][–]); 838,7 (25[M+Na–2H][–])

10-({Hydroxy[4-azidobenzyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina (14)

Do roztoku tetrahydrochloridu 10-({hydroxy[4-aminobenzyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny (500 mg; 0,74 mmol) v deionizované vodě (10 ml) ochlazené na 0 °C byl pomalu přidán NaNO₂ (75 mg; 1,09 mmol) a reakční směs byla za chlazení míchána 20 min. Poté byl pomalu přidán NaN₃ (100 mg; 1,54 mmol) a směs byla míchána dalších 30 min, po této době již neposkytovala pozitivní reakci na diazoniovou sůl s bazickým roztokem 2-naftolu. Reakční směs byla nalita na kolonu se silným aniontovým měničem Dowex 1 (50–100 mesh) v OH[–] cyklu (100 ml). Kolona byla promyta vodou (1 l) a 10% AcOH (1 l). Produkt byl vymyt 5M HCl (1 l) a po odpaření na RVO lyofilizován z vody (25 ml). Po dvoutýdenní ekvilibraci se vzduchem v chladnu a temnu bylo získáno 481 mg kyseliny (**14**)·3,4HCl·3H₂O (88,7 % teorie) ve formě bílého prášku, který stáním na světle tmavne.

Charakterizace:



TLC: EtOH: NH₄OH (5:1), $R_f = 0,25$, UV, roztok KMnO₄, roztok CuSO₄

¹H NMR (299,94 MHz, DMSO-d₆): 2,97-3,60 (bm, 24H; H-1-4, H-9, H-10); 3,64 (bm, 2H, H-5); 4,08 (bm, 4H, H-7); 7,03 (d, ³ $J_{HH} = 7,9$; 2H, H-13); 7,29 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, H-13)

¹³C NMR (75,43 MHz, DMSO-d₆): 36,5 (d, ¹ $J_{CP} = 85,6$; C-10); 49,9 (s, C-2); 50,8 (s, C-4); 51,3 (s, C-1); 50,6 (d, ² $J_{CP} = 105,1$; C-9); 51,8 (s, C-3); 54,1 (s, C-5); 54,8 (s, C-7); 119,8 (d, ⁴ $J_{CP} = 1,6$; C-13); 130,2 (d, ² $J_{CP} = 10,0$; C-11); 132,5 (d, ³ $J_{CP} = 4,8$; C-12); 138,3 (s, C-14); 170,1 (s, C-8); 172,6 (s, C-6)

³¹P NMR (121,42 MHz, DMSO-d₆): 38,1 (s)

EA: (14)·3,4HCl·3H₂O výpočet: C 36,02; H 5,96; N 13,37, Cl 16,43; nalezeno: C 36,06; H 5,74; N 12,87, Cl 16,49

MS(+): 555,9 (100[M+H]⁺); 577,9 (20[M+Na]⁺); 593,9 (16[M+K]⁺)

MS(-): 553,7 (100[M-H]⁻)

4.4 Komplexy

Příprava komplexů 10-({Hydroxy[4-azidobenzyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny s lanthanoidy NH₄[Ln³⁺(14)]

V 10ml baňce byl rozpuštěn ligand (14)·3,4HCl·3H₂O (100 mg) v H₂O (2 ml) dále byl přidán 1,2 ekv. chloridu příslušného lanthanoidu a pH roztoku bylo upraveno přidavkem 3% aq. NH₃ na 9,0. Komplexace byla ponechána probíhat v temnu přes noc za LT. Poté byla reakční směs odpařena na RVO a čištěna flash chromatografií na automatizovaném systému Sepacore (patrona s 12 g silikagelu) v mobilní fázi EtOH s gradientem 0-20% NH₄OH. Produkt byl detekován absorpcí při 254 nm. Spojené frakce s produktem byly odpařeny na RVO a produkt následně odpařen s vodou (2 ml) a lyofilizován z vody (5 ml).

Komplex NH₄[Gd³⁺(14)] byl připraven pro další použití ve větší škále z 300 mg (14)·3,4HCl·3H₂O. kvůli vysoké paramagnetičnosti Gd³⁺ nebyla od tohoto komplexu měřena NMR spektra.

NH₄[Gd³⁺(14)] charakterizace:

TLC: EtOH: NH₄OH (5:1), $R_f = 0,65$, UV, roztok KMnO₄

MS(-): 707,4 (100[M-NH₄]⁻)

Získáno 227 mg.

NH₄[Eu³⁺(14)] charakterizace:

TLC: EtOH: NH₄OH (5:1), $R_f = 0,65$, UV, roztok KMnO₄

³¹P NMR (121,42 MHz, D₂O): 83,7 (bs, SA, 42 %); 76,2 (bs, TSA, 58 %)

MS(+): 721,7 (100[M+H]⁺); 727,7 (88[M+Na-NH₃]⁺); 737,6 (82[M+NH₃]⁺); 749,7 (85[M+2Na-NH₄]⁺)

MS(-): 703,5 [M-NH₄]⁻

Získáno 67 mg.

NH₄[Tb³⁺(14)] charakterizace:

TLC: EtOH: NH₄OH (5:1), $R_f = 0,65$, UV, roztok KMnO₄

³¹P NMR (121,42 MHz, D₂O): 450 (bs, SA, 65 %); 386 (bs, TSA, 35%)

MS(+): 733,8 (83[M+Na-NH₃]⁺); 749,8 (32[M+K-NH₃]⁺); 755,9 (100[M+2Na-NH₄]⁺); 771,8 (76[M+K+Na-NH₄]⁺)

MS(-): 709,7 [M-NH₄]⁻

Získáno 62 mg.

Příprava komplexů 10-({hydroxy[3-(trimethylsilyl)prop-2-ynyl]-fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7- trioctové kyseliny s lanthanoidy H[Ln³⁺(12)]

V 10ml baňce byl rozpuštěn ligand (12) (80 mg) v H₂O (2 ml) (roztok měl pH = 2,16), dále byl přidán 1,2 ekv. acetátu příslušného lanthanoidu a pH roztoku bylo upraveno přidávkem 3% aq. NH₃ z 3,76 na 5,5. Komplexace byla ponechána probíhat přes noc za LT. Poté byla reakční směs nalita na kolonu s náplní slabého kationtového měniče Amberlist CG-50 (200 mesh) v H⁺ cyklu (10 ml) a eluována vodou. Frakce byly jímány po 10 ml, přičemž komplex byl obsažen v prvních dvou frakcích. Spojené frakce byly odpařeny na RVO a produkt následně ještě dvakrát odpařen s vodou (5 ml) kvůli odstranění kyseliny octové.

Komplex H[Gd³⁺(12)] byl připraven pro další použití ve větší škále z 200 mg (12), kvůli vysoké paramagnetičnosti Gd³⁺ nebyla od tohoto komplexu měřena NMR spektra.

H[Gd³⁺(12)] charakterizace:

MS(+): 712,1 (66[M+Na]⁺); 734,1 (100[M+2Na – H]⁺); 750,0 (97[M+Na+K – H]⁺)

MS(–): 615,9 (15[M–TMS][–]); 688,0 (100[M–H][–])

Získáno 240 mg.

H[Eu³⁺(12)] charakterizace:

³¹P NMR (121,42 MHz, D₂O): 81,0 (bs, SA, 41 %); 70,7 (bs, TSA, 59 %)

MS(+): 729,1 [M+2Na–H]⁺

MS(–): 682,9 [M–H][–]

Získáno 89 mg.

H[Tb³⁺(12)] charakterizace:

³¹P NMR (121,42 MHz, D₂O): 420 (bs, SA, 80 %); 350 (bs, TSA, 20%)

MS(+): 735,1 [M+2Na–H]⁺

MS(–): 688,9 [M–H][–]

Získáno 91 mg.

H[Yb³⁺(12)] charakterizace:

³¹P NMR (121,42 MHz, D₂O): –35,0 (bs, TSA₂, 17,2 %); –36,3 (bs, TSA₁, 58,4%), –75,2 (bs, SA, 24,2 %)

MS(+): 678,1 (32[M+2Na–TMS]⁺); 750,1 (100[M+2Na–H]⁺)

MS(–): 631,9 (42[M–TMS][–]); 703,9 (100[M–H][–])

Získáno 95 mg.

4.5 Stanovení hydratačního čísla q

Počet molekul vody koordinovaných na centrální atom komplexu q byl stanoven z rozdílů doby přežívání excitovaného stavu τ komplexu při hydrataci H₂O a D₂O⁴¹ podle vztahu

$$q = 1.05(k_{H_2O} - k_{D_2O}) \quad [20].$$

Kde k_{D_2O} a k_{D_2O} jsou rychlostní konstanty návratu z excitovaného stavu a platí pro ně $k = 1/\tau$.

4.5.1 Stanovení hydratačního čísla u $\text{H}[\text{Eu}^{3+}(\mathbf{12})]$

Při excitaci bylo použito záření o $\lambda = 396$ nm, emise byla měřena při $\lambda = 594$ nm použité vzorky $\text{H}[\text{Eu}^{3+}(\mathbf{12})]$ měly koncentraci 100 mg ml^{-1} .

	H_2O	D_2O
$\tau [\mu\text{s}]$	762	2665
$k [\text{ms}^{-1}]$	1.312	0.375
$q = 0,98$		

Na centrální atom komplexu $\text{H}[\text{Eu}^{3+}(\mathbf{12})]$ je tedy koordinovaná jedna molekula vody.

4.5.2 Stanovení hydratačního čísla u $\text{H}[\text{Eu}^{3+}(\mathbf{14})]$

Při excitaci bylo použito záření o $\lambda = 395$ nm, emise byla měřena při $\lambda = 595$ nm použité vzorky $\text{NH}_4[\text{Eu}^{3+}(\mathbf{14})]$ měly koncentraci 20 mg ml^{-1} .

	H_2O	D_2O
$\tau [\mu\text{s}]$	610	1200
$k [\text{ms}^{-1}]$	1.639	0.833
$q = 0,81$		

Na centrální atom komplexu $\text{NH}_4[\text{Eu}^{3+}(\mathbf{14})]$ je koordinovaná jedna molekula vody.

5 Seznam zkratek

δ	chemický posun
AcOH	kyselina octová
aq.	vodný
Bu	butyl
CA	kontrastní látka
CuAAC	měďnými ionty katalyzovaná alkyn-azidová cykloadice
<i>t</i> -Bu ₃ DO3A	tri- <i>terc</i> -butyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-triacetát
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylkarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -ethyl-diisopropylamin
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
EA	elementární analýza
ekv.	molární ekvivalent
ESR	elektronová spinová rezonance
Et	ethyl
EtOH	ethanol
HMDS	bis(trimethylsilyl)amin (hexamethyldisilazan)
HPLC	vyskoúšinná kapalinová chromatografie
LD ₅₀	střední smrtná dávka
LDA	diisopropylamid lithný
LT	laboratorní teplota
Me	methyl
MRI	zobrazovací magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pr	propyl
<i>R</i> _f	retenční faktor
RVO	rotační vakuová odparka
SA	square-antiprisma
SBM	Solomon–Bloembergen–Morganova teorie

SPIO	small paramagnetic iron oxides
TACN	1,4,7-triazacyklononan
TBAF	tetrabutylamonium fluorid
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TMS	trimethylsilyl
TSAP	twisted square-antiprisma
USPIO	ultra-small paramagnetic iron oxides
ZFS	zero-field splitting

6 Závěr

Cílem práce byla syntéza ligandu pro vazbu Gd^{3+} na bázi fosfinátového derivátu DO3A, který by obsahoval terminální alkynová skupinu a umožňoval tak navázání přes „click reakci“. Tento ligand byl připraven a charakterizován NMR spektry a MS. Charakterizovány byly také prekursor k jeho syntéze a komplexy s několika lanthanoidy. Optimalizovaná pětikroková syntéza má celkový výtěžek přibližně 23 % z výchozího prop-2-ynylbromidu. Byly nalezeny a optimalizovány podmínky pro novou variantu Moerditz-Itani reakce v bezvodém prostředí. Kvůli tendenci prop-2-ynylfosfinové kyseliny izomerizovat na allenovou formu byla v reakcích použita její TMS chráněná varianta. Ze stejného důvodu je i finální ligand takto chráněn.

Připraven byl také komplementární fosfinátový derivát DO3A, který obsahuje skupinu aromatického azidu. Syntéza tohoto ligandu je snadná jednokroková reakce v výtěžkem 88 % z dobře popsaného a charakterizovaného ligandu.

Z obou ligandů byly připraveny komplexy lanthanoidů, s Gd^{3+} komplexem s alkynovou skupinou byla vyzkoušena modelová CuAAC reakce s fluorogenním substrátem.

Bylo zjištěno, že komplexy obou cílových ligandů obsahují v koordinační sféře atomu centrálního kovu jednu molekulu vody a jsou tedy vhodnými kandidáty na MRI kontrastní látku.

Část výsledků diplomové práce byla prezentována formou posteru na setkání COST TD1004 Theragnostics Imaging and Therapy 2012 v Londýně.

V dostatečném množství byly připraveny Gd^{3+} komplexy uvedených ligandů, které budou použity pro další přípravu a výzkum potenciálních kontrastních látek.



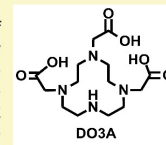
Monophosphinic acid DOTA analog for "click chemistry"

Ondřej Zemek, Jan Kotek and Petr Hermann

Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030, 128 43, Prague 2, Czech Republic
email: zemek@natur.cuni.cz

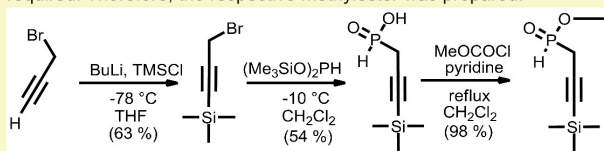
Introduction

The contrast agents (CA) are administered in more than 30 % of all MRI investigations and are essential in many types of MRI diagnostics. Due to the significant toxicity of used paramagnetic metal ions (Gd^{3+} or Mn^{2+}), complexes with strongly binding ligands have to be used. The design of ligand has crucial influence on both efficiency and tissue specificity of CA. The aim of this work was to prepare DO3A-based ligand with additional phosphinic acid pendant arm that bears terminal alkyne function to allow easy coupling to a broad range of functional molecules via Cu^+ catalyzed alkyne-azide cyclization ("click reaction"). The phosphinic moiety was proved to enhance efficiency by rising water exchange rate in metal ion vicinity [1]. The 1,2,3-triazole linker formed by "click reaction" provides rigid connection thus minimizing undesirable tumbling of complex moiety.

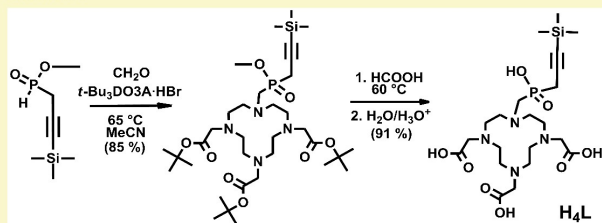


Synthesis

The phosphinic acid precursor was prepared from propargyl bromide terminally protected with TMS. Without the protection the following reaction did not give satisfactory yields due to the presence of acidic acetylenic hydrogen atom. The free phosphinic acid failed to react in Moedritzer-Irani reaction due to lability under the harsh conditions required. Therefore, the respective methylester was prepared.



The methylester reacted smoothly under mild conditions in absence of water with $t-Bu_3DO_3A$ in Mannich-type reaction. Following deprotection provided desired ligand H_4L with TMS-protected terminal acetylenic carbon that can be easily deprotected *in situ* with F^- ions prior to "click reaction".



The complexes of lanthanides (Gd^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} and Yb^{3+}) were prepared and characterized. The EuL complex was used for determination of hydration number based on difference in deexcitation rates in H_2O and D_2O according to [3] and one molecule of water was found to be coordinated to metal ion. After deprotection of $t-Bu$ groups, the complexes with desired lanthanides must be formed before "click reaction" because of high affinity of DO3A-based ligands towards Cu^{2+} ions. Otherwise it would lead to contamination of the product with Cu^{2+} complex.

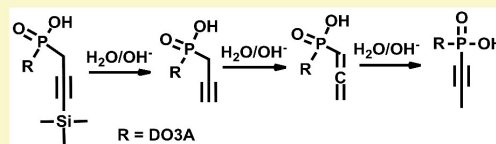
Conclusion

- New macrocyclic DO3A-based ligand with the TMS-protected terminal alkyne bound on phosphinic acid pendant arm was prepared and characterized.
- The respective complexes of lanthanides (Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} and Yb^{3+}) were prepared and characterized.
- Cu^+ catalyzed azide-alkyne cycloaddition ("click reaction") with GdL complex were proved while TMS deprotection was performed *in situ*.
- Coumarine based Potential bimodal (MRI/optical) imaging reporter was prepared.
- The syntetized complex opens new possibilities for the preparation of new enhanced MRI CA or bimodal imaging reporters of various design.

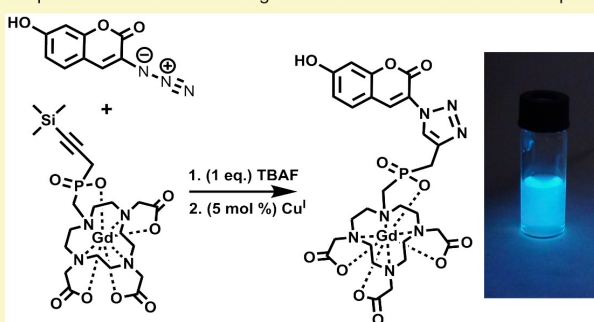
Literature

- [1] Rudovský, J.; Cigler, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vojtěšek, P.; Lukeš, I.; Peters, J. A.; Vander Elst, L.; Müller, R. N. Chem. Eur. J. 2005, 11, 2373
- [2] Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A. S.; Williams J. A. G. and Woods, M. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1999, 493
- [3] Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q.; Org. Lett. 2004, 4603

The propargylphosphinic acid and its derivatives are prone to acetylene-allenic rearrangement in even slightly alkaline conditions. The TMS group is liable to deprotection in basic environment followed by quick allene formation. The allenephosphinic acid further rearranges to the most stable prop-1-ynylphosphinic acid if left in alkaline solution.



The "click reaction" of GdL complex with 3-azidocoumarin was chosen due to the ability to "turn on" the fluorescence of coumarin moiety after successful formation of the triazole ring [3]. This allowed easy optimization of reaction conditions and the product may be further used as bimodal CA. The TMS was deprotected *in situ* with fluoride ions before Cu^{2+} salt was added. There was no complex of Cu^{2+} detected in the product which manifests high kinetic inertness of the GdL complex.



Acknowledgement

This work was financially supported by Grant Agency of Czech republic, No. P207/11/1437. Participation was provided by COST TD1004.

8 Seznam použité literatury

- (1) The Basics of MRI <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/> (accessed Aug 27, 2011).
- (2) Jahnke, K.; Doolittle, N. D.; Muldoon, L. L.; Neuwelt, E. A. *Neurosurg Focus* **2006**, *21*, E11.
- (3) Roditi, G. *Clin. Risk* **2009**, *15*, 47–53.
- (4) Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901–927.
- (5) Kirchin, M. A.; Runge, V. M. *Top. Magn. Reson. Imaging* **2003**, *14*, 426.
- (6) Ranganathan, R. S.; Raju, N.; Fan, H.; Zhang, X.; Tweedle, M. F.; Desreux, J. F.; Jacques, V. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 6856–6866.
- (7) Weinmann, H.; Brasch, R.; Press, W.; Wesbey, G. *Am. J. Roentgenol.* **1984**, *142*, 619–624.
- (8) Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901–927.
- (9) Li, W.; Fraser, S. E.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1413–1414.
- (10) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352.
- (11) Caravan, P. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 512.
- (12) J. Rudovský, *Diplomová práce*, PŘF Univerzita Karlova, Praha, **2002**, 17.
- (13) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352.
- (14) Rudovský, J.; Cígler, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vojtíšek, P.; Lukeš, I.; Peters, J. A.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Chem. - Eur. J.* **2005**, *11*, 2373–2384.
- (15) Harvey, J. S.; Giuffredi, G. T.; Gouverneur, V. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1236–1239.
- (16) Karanewsky, D. S.; Badia, M. C.; Cushman, D. W.; DeForrest, J. M.; Dejneka, T.; Loots, M. J.; Perri, M. G.; Petrillo Jr, E. W.; Powell, J. R. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 204–212.
- (17) Blanchard, C.; Vaultier, M.; Mortier, J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8863–8866.
- (18) Ortial, S.; Montchamp, J.-L. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3134–3137.
- (19) Vallée, M. R. J.; Artner, L. M.; Dervede, J.; Hackenberger, C. P. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9504–9508.
- (20) Belakhov, V.V.; Yudelevich, V. I.; Komarov, E.B.; Ionin, B. I.; Komarov, V.Ya.; Zakharov, V.I.; Lebedev, V.B.; Petrov, A.A. *Zh. Obshchei Khim.* **1983**, *53*, 1493–1503.
- (21) Afarinkia, K.; Yu, H. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 781–783.
- (22) Hennion, G. F.; Sheehan, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1964–1966.
- (23) Boyd, E. A.; Regan, A. C.; James, K. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4223–4226.
- (24) Hewitt, D. *Aust J Chem* **1979**, *32*, 463–464.
- (25) Fougère, C.; Guénin, E.; Hardouin, J.; Lecouvey, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 6048–6054.
- (26) Abrunhosa-Thomas, I.; Sellers, C. E.; Montchamp, J.-L. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2851–2856.

- (27) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's protective groups in organic synthesis 4th edition*; John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, **2007**, 927-933.
- (28) Trost, B. M.; Huang, X. *Chem. Asian J.* **2006**, *1*, 469–478.
- (29) Hoogboom, J.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15058–15059.
- (30) Bernard, S.; Defoy, D.; Dory, Y. L.; Klarskov, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6127–6130.
- (31) Moedritzer, K.; Irani, R. R. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1603–1607.
- (32) Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522–524.
- (33) Vitha, T.; Kubíček, V.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Lukeš, I.; Peters, J. A. *Dalton Trans.* **2009**, 3204.
- (34) Rudovský, J.; Hermann, P.; Botta, M.; Aime, S.; Lukeš, I. *Chem. Commun.* **2005**, 2390–2392.
- (35) Rudovský, J.; Botta, M.; Hermann, P.; Hardcastle, K. I.; Lukeš, I.; Aime, S. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 975–987.
- (36) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603–4606.
- (37) Dirks, A. (Ton) J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 1129–1138.
- (38) Friscourt, F.; Boons, G. J. *Org. Lett.*
- (39) Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Mainero, V.; Aime, S. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 112–117.
- (40) Deprèle, S.; Montchamp, J.-L. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *643-644*, 154–163.
- (41) Dickins, R. S.; Parker, D.; de Sousa, A. S.; Williams, J. A. G. *Chem. Commun.* **1996**, 697.

Poděkování

Především bych rád poděkoval svým rodičům a rodině za podporu, které se mi dostalo během dosavadního studia.

Velký dík patří mému školiteli doc. Janu Kotkovi za ochotu, obětavost, trpělivost a odbornou pomoc během celé mé práce. Vždy si dokázal udělat ve svém nabitém programu čas, když jsem něco akutně potřeboval ať už po stránce odborné tak i v zákrutách formální stránky studia. Naopak mě poskytl nevídanou volnost v chemické seberealizaci.

Dále bych rád poděkoval všem, kteří ke vzniku této práce nějak přispěli:

celému osazenstvu laboratoře „19“ za vytvoření vynikající atmosféry

prof. Petru Hermannovi za mnoho odborných rad a návrhů především kolem chemie fosforu

prof. Ivanu Lukešovi za záštitu nad celým pracovním kolektivem

doc. Vojtovi Kubíčkově za udržování laboratoře v co nejlepším stavu

Janu Plutnarovi, Sandrovi a Bohoušovi Drahošovi za zaškolení a pomoc s NMR

Mirkovi a Honzovi B. za seznámení s prací na MS spektrometru a další pomoc v laboratoři

Vládovi Zbraňkovi za pomoc s PC a softwarem

Duckovi a Kubovi za motivaci a inspiraci

všem, kteří umí nadchnout mladé lidi pro přírodní vědy a chemii zvláště

a nakonec Grantové agentuře ČR za financování této práce prostřednictvím grantu P207/11/1437.